

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Polyzomie chromozómu 17 u karcinomu prsu a její
význam pro diagnosticko-léčebnou rozvahu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Hana Ondryášová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Vladimíra Koudeláková
Termín odevzdání práce:	14.5.2010

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Hana Ondryášová

Chtěla bych poděkovat Mgr. Vladimíře Koudelákové za odborné vedení bakalářské práce, poskytnutí literatury, rad a konzultačních hodin, RNDr. Radku Trojancovi, Ph.D za poskytnutí literatury, odborných rad a připomínek k dané problematice, doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. za poskytnutí pracovního zázemí a Institutu biostatistiky a analýz LF MU Brno za poskytnutí klinických dat z Herceptinového registru. Ráda bych rovněž poděkovala RNDr. Boženě Braunerové za cenné rady a připomínky, Mgr. Janě Füstové za provedení statistických analýz, Soně Mlčochové za usnadnění a pomoc při práci v Laboratoři experimentální medicíny.

I. BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:

Jméno a příjmení autora	Hana Ondryášová
Název práce	Polyzomie chromozómu 17 a její význam pro diagnosticko-léčebnou rozvahu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř experimentální medicíny, LF UP a FN Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Vladimíra Koudeláková
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	<p>Prediktivní onkologie se snaží o nalezení specifických markerů nádoru, na základě kterých by bylo možné určit nejvhodnější léčebný režim a individualizovat tak léčbu pro jednotlivé pacienty. Jedním z nástrojů prediktivní onkologie je v dnešní době i cytogenetické vyšetření, které je užíváno k určení prognózy a predikci účinnosti terapie nádorového onemocnění (např. karcinomu prsu). Jednou z nejčastěji používaných cytogenetických metod je fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH), jejíž velkou výhodou je vysoká senzitivita a specifita. Za pomoci FISH byl sledován výskyt amplifikace genů <i>c-myc</i>, <i>ccnd1</i> a polyzomie CH8 a CH11 ve 151 vzorcích tkáně karcinomu prsu. Ze 151 vzorků byla u 49 dříve zjištěna polyzomie CH17, která je spojována s negativní prognózou a nejasnou predikcí. Cílem této práce bylo srovnání výskytu amplifikace <i>c-myc</i>, <i>ccnd1</i> a polyzomie CH8 a CH11 u polyzomických pacientů a pacientů s fyziologickým počtem CH17. U pacientů z Olomouckého komplexního onkologického centra byla získána zaslepená a anonymizovaná klinická data, která byla dále korelována s nalezenými cytogenetickými změnami.</p>
Klíčová slova	karcinom prsu; <i>c-myc</i> ; <i>ccnd1</i> ; FISH; chromozóm 17; CEP17; chromozóm 8; chromozóm 11
Počet stran	68
Počet příloh	2
Jazyk	Český

II. BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

Autor's first name and surname	Hana Ondryášová
Title	Polysomy of chromosome 17 in breast cancer patients and its impact for tailored therapy
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, Palacky University and Faculty Hospital Olomouc
Supervisor	Mgr. Vladimíra Koudeláková
The year of presentation	2010
Abstrakt	<p>The aim of predictive oncology is search for specific tumor markers in order to determine the appropriate cancer therapy and tailor treatments to individual cancer patients. A major tool in predictive oncology today is also cytogenetics which is used to determine prognosis and predict the effectiveness of cancer therapy (eg breast cancer). One of the most commonly used cytogenetic methods is fluorescence <i>in situ</i> hybridization (FISH) whose main advantages are high sensitivity and specificity. Amplification of <i>c-myc</i> and <i>ccnd1</i> genes and polysomy of chromosomes 8 (CH8) and 11 (CH11) were determined by FISH in 151 breast cancer tissue samples. Of the 151 samples, in 49 had been detected previously polysomy of chromosome 17 (CH17), which is associated with adverse prognosis and ambiguous prediction. The aim of this thesis was to compare the incidence of amplification of <i>c-myc</i>, <i>ccnd1</i> genes and polysomy of CH8 and CH11 in CH17 polysomic patients and in patients with normal CH17 copy number. Anonymized and blind clinical data from patients of the Olomouc Cancer Center were analysed and correlated with founded cytogenetic changes.</p>
Keywords	breast cancer; <i>c-myc</i> ; <i>ccnd1</i> ; FISH; chromosome 17; CEP17; chromosome 8; chromosome 11
Number of pages	68
Number of appendices	2
Language	Czech

III. OBSAH

I.	BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE.....	3
II.	BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION.....	4
III.	OBSAH.....	5
IV.	CÍLE PRÁCE.....	7
V.	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
1.	Úvod.....	8
2.	RAKOVINA PRSU.....	9
2.1.	Rizikové faktory vzniku rakoviny prsu.....	9
3.	VZNIK NÁDORU.....	10
3.1	Molekulární podstata mutací a dalších genetických změn nastávajících v nádorových buňkách.....	11
3.2.	Geny mutované v nádorových buňkách.....	14
3.2.1.	Protoonkogeny.....	14
3.2.2.	Tumorsupresorové geny.....	17
3.2.3.	Regulační proteiny apoptózy.....	18
3.2.4.	Reparační geny.....	19
4.	KLINICKÉ PŘÍZNAKY.....	19
5.	PREVENCE.....	19
6.	ROZDĚLENÍ NÁDORŮ PRSU.....	20
6.1.	Anatomie prsu, především mléčné žlázy.....	20
6.2.	Sporadické karcinomy prsu.....	21
6.2.1.	Karcinom in situ.....	22
6.2.2.	Invazivní formy karcinomu.....	22
6.3.	Hereditární karcinomy prsu.....	23
7.	DIAGNOSTIKA.....	23
7.1.	Tumorové markery u rakoviny prsu.....	23
7.1.1.	CA 15-3.....	24
7.1.2.	Karcinoembryonální protein.....	24
7.1.3.	Tkáňový polypeptidový antigen.....	24
7.1.4.	Estrogenové receptory.....	24
7.1.5.	Progesteronové receptory.....	25
7.1.6.	her-2/neu.....	26
7.1.6.1.	Polyzomie chromozómu 17.....	29

7.1.7.	Receptor pro epidermální růstový faktor.....	32
7.1.8.	p53.....	32
7.1.9.	brca1 a brca2.....	33
7.1.10.	c-Myc.....	34
7.1.11.	Cyklin D1.....	37
8.	LÉČBA RAKOVINY PRSU.....	39
VI.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
1.	ZJIŠTĚNÍ STATUTU GENŮ C-MYC, CCND1 A CHROMOZÓMŮ 8 A 11 U PACIENTŮ S KARCINOMEM PRSU A POLYZOMIÍ CHROMOZÓMU 17.....	40
1.1.	Materiál, pomůcky a přístrojové vybavení.....	41
1.2.	Vzorky patientských tkání.....	41
1.3.	Složení roztoků.....	42
1.4.	Použité metody a pracovní postupy.....	42
1.4.1.	Kultivace bakterií.....	42
1.4.2.	Izolace plazmidu.....	43
1.4.3.	Fluorescenční značení izolovaného plazmidu.....	44
1.4.4.	Deparafinizace řezů tkání.....	46
1.4.5.	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	46
1.5.	Výsledky.....	46
1.6.	Diskuze a závěr.....	52
VII.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54
VIII.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	63
IX.	PŘÍLOHY.....	67

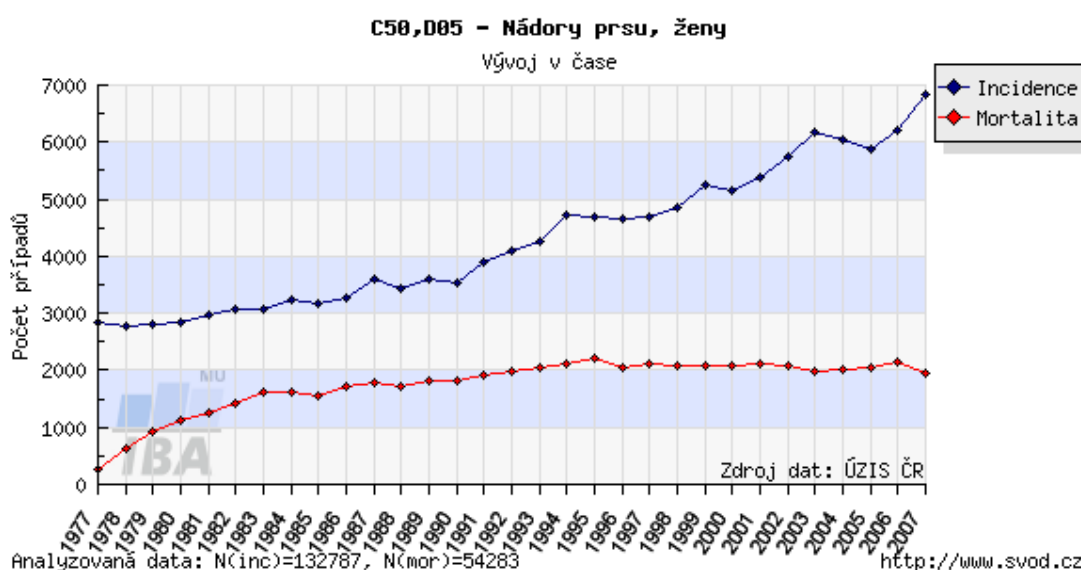
IV. CÍLE PRÁCE

Mezi cíle této bakalářské práce patřilo vypracování literární rešerše se zaměřením na karcinom prsu, protoonkogeny *c-myc* a *ccnd1*. Během této práce byly vyšetřeny vzorky pacientů s rakovinou prsu, u nichž byla již dříve diagnostikována polyzomie chromozómu 17. Následně byly vyšetřeny vzorky karcinomu prsu, u nichž byl počet kopií chromozómu 17 fyziologický. U těchto pacientů byly vyšetřeny geny *c-myc* a *ccnd1* spolu s chromozómy, na nichž jsou geny lokalizovány (chromozóm 8 a 11). Cílem práce bylo charakterizovat nalezené rozdíly u těchto dvou skupin pacientů s karcinomem prsu a následně korelovat cytogenetické změny s klinickými daty získanými z Herceptinového registru. Tato práce by měla napomoci při určení prognózy pacientů s karcinomem prsu a polyzomií chromozómu 17 a usnadnit tak výběr nejúčinnějšího léčebného režimu.

V. TEORETICKÁ ČÁST

1. ÚVOD

Karcinom prsu je nádorové maligní onemocnění postihující ve valné většině případů pouze ženy. Po jiných kožních nádorech je karcinom prsu nejčastějším zhoubným novotvarem u žen a v roce 2005 představoval 17% nově diagnostikovaných nádorů u českých žen (J. Mužík et al., 2009). Jedná se také o malignitu nejčastěji způsobující úmrtí u žen (J. Koutecký et al., 2004). Trend incidence byl od roku 1977 do roku 2007 rostoucí (viz obr.1). V České republice byla roku 2007 nově diagnostikována rakovina prsu u 6850 pacientek, což představuje 129,9 nádorů na 100 tisíc žen. Roku 2007 rakovině prsu podlehl 1932 pacientek, což představuje 36,47 žen ze 100 tisíc. Ve srovnání s ostatními zeměmi světa zaujímala roku 2002 Česká republika 23. místo v počtu nově diagnostikovaných malignit prsu na 100 tisíc žen (nejvyšší ve Švédsku, Dánsku a USA) a 14. místo v počtu úmrtí na 100 tisíc žen způsobené rakovinou prsu (nejvyšší v Belgii, Dánsku a na Maltě). Trend mortality byl v rámci České republiky v celém sledovaném období rostoucí, i když v posledních letech stagnoval až mírně klesal. Pokles mortality můžeme spojovat se zavedením preventivních mamografických vyšetření u kritické skupiny žen a také značnou účinností nové cílené léčby. Ač je léčba onkologických onemocnění v dnešní době poměrně účinná, indikovaná na základě molekulárně biologických či cytogenetických vyšetření, u některých sporných skupin pacientek, např. s polyzomií chromozómu 17 či triple negativních (PR, ER, HER-2/neu negativní status) není zcela jasné, jaký léčebný postup by byl pro tyto pacientky optimální (Dušek et al., 2005).



Obr.1: Vývoj incidence a mortality rakoviny prsu v České republice od roku 1977 do roku 2007 (Dušek et al., 2005)

2. RAKOVINA PRSU

Rakovina prsu patří mezi nádorová onemocnění definovaná jako chorobný stav charakterizovaný nekoordinovatelným dělením abnormálních buněk s postupným šířením do okolních tkání, průnikem do mízního a krevního systému a napadáním vzdálených orgánů (**Petrželka et al., 2003**). Termínem rakovina prsu jsou označovány různé histologické formy maligních nádorů vznikajících z epiteliálních buněk mléčné žlázy (**Vyzula et al., 2004**). Maligní buňky se od normálních odlišují svou morfologií, energetickým metabolismem a odpovědí na růstové faktory (**Eckschlager et al., 2002**). Nádorová onemocnění jsou podmíněna změnami v genomu buňky.

2.1. RIZIKOVÉ FAKTORY PRO VZNIK NÁDORU PRSU

Mezi nejvýznamnější faktory zvyšující riziko vzniku nádorového bujení v prsní tkáni patří vyšší věk. Incidence zhoubného onemocnění prsu prudce stoupá po dosažení 40. roku, s tím, že nejvíce (přibližně 50%) pacientek se nachází ve věkovém rozmezí 53 až 73 let (**Mužík et al., 2009**). Právě kvůli prudkému vzestupu rizika u žen nad 40 let mají ženy od 45 let každé 2 roky nárok na bezplatné mamografické vyšetření, jímž je možné detekovat nádory v časném stádiu a tím snížit mortalitu i morbiditu (**Koutecký et al., 2004**). Mamografickou detekci mohou ztížit jiná onemocnění prsu jako cystické adenomy nebo duktální papilomy, díky nimž může být počínající tumor přehlédnut. Tato onemocnění jsou proto považována za další rizikový faktor (**Klener, 2002**).

Vzledem k hormonální závislosti malignit prsu je důležitým faktorem také délka expozice estrogenům, jako časný nástup první menstruace (před 12. rokem), bezdětnost, pozdní menopauza (po 55. roku) a pozdní první gravidita (po 35. roku). Z hlediska zvýšení pravděpodobnosti výskytu nádoru prsu není vhodná hormonální substituční léčba po menopauze. Minimální zvýšení rizika rakoviny prsu při užívání hormonální antikoncepce kompenzuje redukce rizika sporadického karcinomu vaječnicků. Riziko vzniku karcinomu prsu je naopak nižší u žen s nepravidelným menstruačním cyklem (**Klener, 2002; Adam et al., 2003**). Celkově vysoká hladina pohlavních hormonů, ať už estrogenů či androgenů, prokazatelně zvyšují riziko vzniku rakoviny prsu. Určit, který z hormonů je pro vznik tumoru prsu nejdůležitější, je náročné díky provázanosti jejich metabolických drah. Vysoká hladina androgenů také zvyšuje riziko vzniku tumoru prsu, dokonce často pozorujeme vyšší korelaci rizika s hladinou androstendionu a testosteronu než s hladinami estrogenů (**Key, 2002**).

Obezita, nadměrný příjem tuků a nedostatečná pohybová aktivita zvyšuje incidenci nejen karcinomu prsu, ale i tlustého střeva, dělohy, ledvin a jícnu. Vztah mezi obezitou a

rakovinou prsu a tlustého střeva je dokonce nezávislý na přítomnosti jiných rizikových faktorů (Adam et al., 2003). Velký obvod pasu a poměr obvodu pasu k bokům jsou spojovány s vyšším rizikem rakoviny prsu, obzvláště u postmenopauzálních žen, které nikdy neužívaly hormonální substituční léčbu. Naopak nižší riziko rakoviny prsu je u premenopauzálních žen s vyšším obvodem pasu (Huang et al., 1999). U postmenopauzálních žen se při vzestupu BMI nad 24 lineárně zvyšuje incidence karcinomu prsu. Přibližně 10% postmenopauzálních nádorů prsu je důsledkem vysokého BMI a dalších 10% důsledkem nedostatečné pohybové aktivity. Za zvýšenou pohybovou aktivitu prokazatelně snižující náchylnost k malignitám prsu o 20-40% se považuje 30-60 minut cvičení denně. Obezita vede ke změnám v metabolismu endogenních hormonů, pohlavních steroidních hormonů, inzulinu, inzulinu podobného růstového faktoru-1 (ILGF-1) a jeho vazebného proteinu. U žen i mužů se zvyšuje hladina estrogenů prostřednictvím jejich tvorby z androgenů v tukové tkáni. V současné době je prokázána také spojitost mezi vyšší hladinou ILGF-1 a vyšší incidencí nádoru prsu a prostaty (Adam et al., 2003).

Z hlediska rodinné anamnézy jako rizikového faktoru je významný hereditární karcinom prsu podmíněný autozomálně dominantně děděnou mutací genů *brca1* a/nebo *brca2* (Klener, 2002).

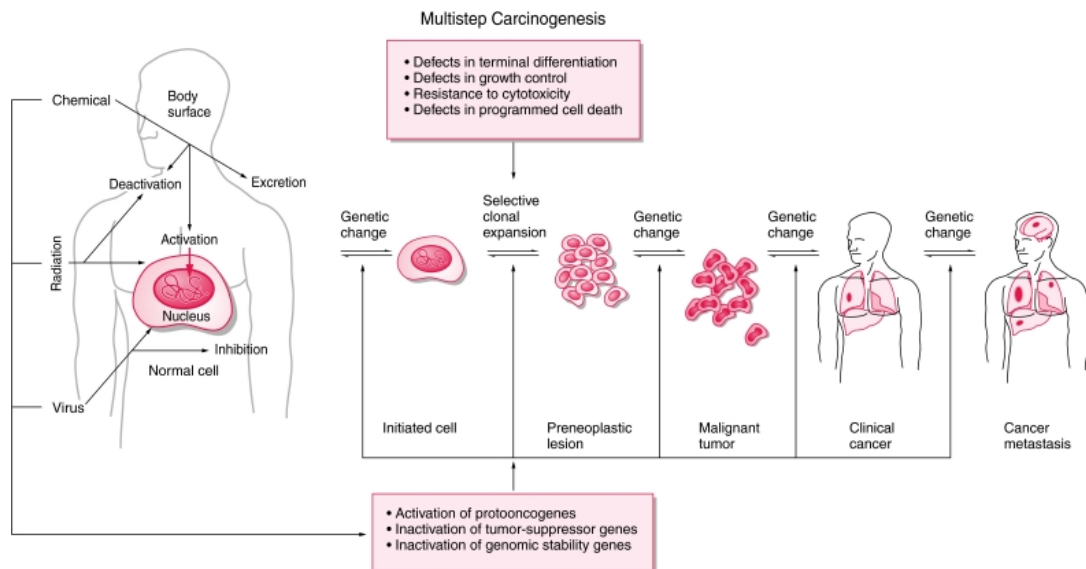
Také ionizující záření prokazatelně vyvolává maligní onemocnění prsu. Ionizujícímu záření můžeme být vystaveni při ozařování zánětu, léčbě jiného nádorového onemocnění např. rakoviny plic nebo při mamografickém vyšetření, kdy nejsou rizika definitivně zhodnocena, ale toto vyšetření se nedoporučuje u mladších žen. U žen naopak starších převažuje možnost úspěšné léčby a snížení úmrtnosti při včasné diagnostice nádoru nad rizikem představovaným mamografií (Adam et al., 2003; Klener, 2002).

3. VZNIK NÁDORU

Vznik a vývoj nádoru je několikastupňový proces, na jehož počátku stojí změna DNA buňky vyvolaná reaktivními formami genotoxických onkogenů, tvorbou hydroxyradikálů, radiací popř. viry. Dochází k mutaci specifických genů, protoonkogenů a tumorsupresorů. Tato mutace se odráží ve změně vlastností pozměněné buňky i buněk z ní vznikajících (Eckschleger & Průša, 2002). Pro maligní buňky jsou typické tyto znaky: soběstačnost v produkci růstového signálu, necitlivost k signálům zastavujícím buněčný cyklus, porucha apoptózy, neomezený replikační potenciál (imortalizace), posílení angiogeneze, nestabilita genomu, tvorba metastáz a tkáňová invazivita (Adam et al., 2003). Modifikované buňky se obvykle velice rychle dělí a tím se snižuje pravděpodobnost opravy poškozené DNA. Celý proces přeměny somatické buňky na nádorovou se nazývá neoplastická transformace (Eckschleger & Průša, 2002). V rámci neoplastické transformace rozeznáváme 5 etap (Obr.2): již dříve zmiňovanou iniciaci, kdy vlivem

vnějších nebo vnitřních faktorů dochází ke genetickým změnám, které se po dlouhou dobu vůbec nemusí funkčně projevit. Genetické mutace mohou být také přenášeny z generace na generaci v germinálních buňkách, poté se jedná o dědičně podmíněné nádory (Adam et al., 2003; Klener, 2002; Petruželka et al., 2003).

V další fázi, promoci, vlivem dalších podnětů, tzv. promotorů klonální expanze, nastávají v buňkách poruchy diferenciaci a v klinickém obraze nacházíme tzv. karcinom *in situ*. Pro účinnost promotorů je nezbytné, aby již buňka byla iniciovaná. V tomto stádiu se ještě maligní přeměna může zastavit díky reverzibilitě účinku promotorů, jinak nastává stádium konverze a vzniká maligní klon. Takové buňky ve stádiu progresu ztrácí schopnost odpovídat na regulační mechanismy, nádor lokálně roste. V poslední fázi, metastatické, se maligní buňky šíří mimo prvotní ložisko (Adam et al., 2003; Eckschleger & Průša, 2002; Klener, 2002).

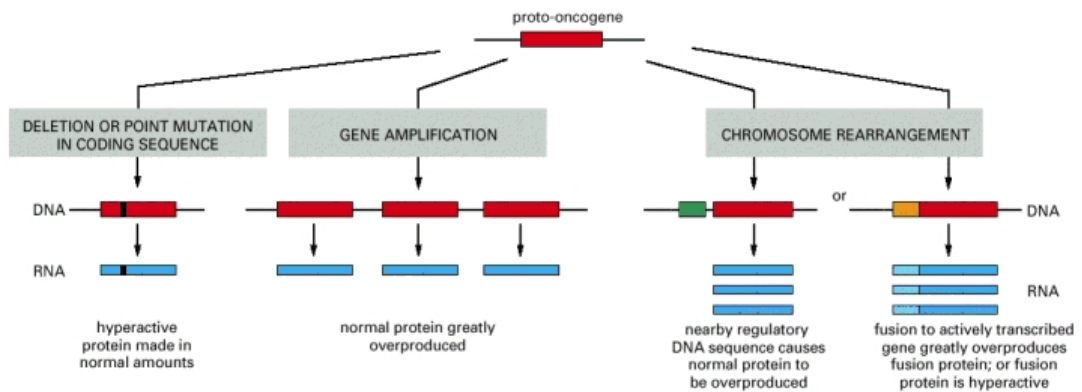


Obr.2: Vícestupňový vznik a vývoj tumoru

Celý proces můžeme rozdělit na iniciaci, promoci, maligní konverzi, progresi nádoru a poslední metastatickou fázi (viz. text) (Weston et al., 2003).

3.1. MOLEKULÁRNÍ PODSTATA MUTACÍ A DALŠÍCH GENETICKÝCH ZMĚN NASTÁVAJÍCÍCH V NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH

U nádorových buněk lze nalézt celou řadu alterací nejen počtu genů nebo jejich uspořádání, ale i alterace počtu chromozómů. Převážná většina změn, nalezených u nádorových buněk, je způsobena mutacemi v somatických buňkách během vývoje jedince. Mezi nejčastější strukturní aberace genů řadíme mutace bodové, delece, amplifikace a přestavby chromozómů (Obr.3).

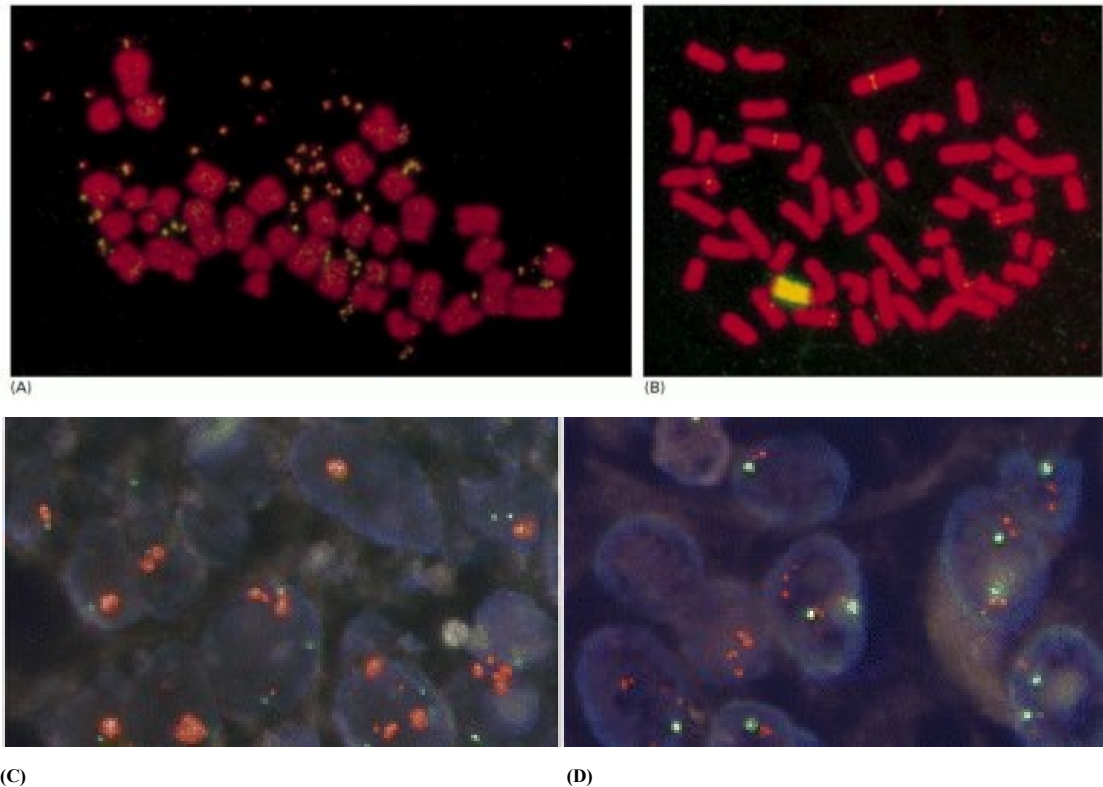


Obr.3: Tři možné způsoby přeměny protoonkogenů na onkogeny (Alberts et al., 2002).

Bodová mutace nastává samovolně nebo vlivem vnějších faktorů, dochází při ní k záměně bazí v DNA. Substituce jediného nukleotidu může změnit kódující triplet a tím způsobit v genovém produktu záměnu aminokyseliny za jinou (Petruželka et al., 2003). Bodové mutace můžeme dále dělit na „missense“ mutace, která vede k vlození jiné aminokyseliny. Záměna jedné aminokyseliny může vést ke změně konformace proteinu a tím ke ztrátě funkce proteinových produktů antionkogenů nebo naopak získání funkce nové u proteinů kódovaných onkogeny. Tzv. tichá mutace nijak neovlivňuje strukturu proteinu, neboť i přes záměnu nukleotidu kóduje triplet bazí stejnou aminokyselinu. Nonsense mutace vede k ukončení syntézy proteinu v místě mutace, nový triplet bazí nekóduje žádnou aminokyselinu, ale ukončení translace (Cibula et al., 2009). V rámci bodových mutací můžeme rozlišit tranzice, kdy dochází k náhradě purinového nukleotidu jiným purinovým či pyrimidinového nukleotidu jiným pyrimidinovým, a transverze, při níž dochází k záměně purinového nukleotidu s pyrimidinovým či naopak. V mutagenních procesech dochází častěji k tranzicím, díky methylaci cytozinových zbytků. Více než 30% bodových mutací tvoří právě tranzice (Nussbaum et al., 2004)

Amplifikace je chápána jako zmnožení genetického materiálu, které může způsobit aktivaci onkogenů a zvýšit produkci funkčně normálního proteinu. Amplifikace má za následek zmnožení sekvence onkogenů a s nimi sousedících sekvencí. Amplifikace je cytogeneticky detekovatelná jako tzv. double minutes chromozómů, jako oblast chromozómu s nadbytkem intenzity signálu (amplifikace v rámci chromozómu) či jako zmnožení signálů při fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) (viz obr.4). Ke vzniku double minutes dochází nejčastěji v důsledku chromozomálních zlomů zmnožením malých úseků extrachromozomální DNA, o velikosti od 0,5 do 10 megabází. Takto vzniklé zlomky DNA postrádají centromeru a do dceřiných buněk se dostávají zcela náhodně. Tím vznikají buňky, v nichž daný genetický materiál chybí nebo nadbývá. K amplifikacím často dochází i v rámci jednotlivých chromozómů, kdy dojde ke zmnožení DNA sekvence. Zmnožený úsek ovšem zůstává zachován a replikuje se společně s příslušným chromozómem. Tento

typ amplifikace bývá častým nálezem u solidních nádorů. Mezi nejčastější případy amplifikace patří i nadměrná exprese *c-erbB-2* u karcinomu prsu (DeVita et al., 2008; Klener, 2002; Petruželka et al., 2003).



Obr.4: Možnosti amplifikace genu (*myc*)

A-double minutes (žluté útvary)

B- zmnožení kopií genu v rámci chromozómu (homogenně zbarvená žlutá oblast). Jednotlivé kopie genu *myc* v rámci chromozómu jsou patrné jako žluté signály na červených chromozómech (Alberts et al., 2002).

C,D - zobrazení amplifikace genu pomocí FISH (oranžové signály odpovídají počtu kopií genu *myc*, zelené centromeře CH8) C-amplifikované signály jsou sdruženy do klastrů, D- zvýšený počet signálů *myc* (Ooi et al., 2009)

Přestavba chromozómů je poměrně široký pojem zahrnující delecii, inverzi, inzerci a translokaci (Petruželka et al., 2003).

Delece, ztráta úseku DNA, vede podobně jako bodová mutace k aktivaci onkogenu s následnou produkcí pozměněného proteinu se zvýšenou aktivitou nebo k inaktivaci antionkogenu, který následně ztrácí svou funkci (Klener, 2002).

Inverze vzniká po dvojnásobném zlomu v rámci jednoho chromozómu a následném otočení odděleného segmentu o 180°. Důsledkem inverze je přiblížení určitého

genu nebo jeho části k jinému, funkčně odlišnému genu. Utváří se tak gen hybridní za vzniku abnormálního proteinu (**Klener, 2002**).

Inzerce je změna, při níž dochází k přidání úseku DNA. Některé malé inzerce nebo delece postihují pouze malý počet párů bazí. Pokud tento počet není roven násobku tří a dochází-li k delecí či inzerce v kódující sekvenci, mění se čtecí rámec. Pokud disponovaný úsek obsahuje počet bazí rovný násobku tří, dochází ke změně aminokyselinové sekvence ve výsledném proteinu, aminokyseliny nadbývají nebo chybí. Delece či inzerce větších rozměrů jsou poměrně vzácné, tvoří jen 6% mutací zodpovědných za onemocnění (**Klener, 2002; Nussbaum et al., 2004**).

Za chromozomální translokaci se označuje přenesení nebo výměna části chromozómu na jiné místo téhož nebo jiného chromozómu. Translokovaný fragment DNA se přemístěním může dostat pod vliv silného konstitutivního promotoru jiného genu a produkovat nadměrné množství normálního proteinu nebo může vytvořit fúzní gen, produkující chimérický (fúzní) protein s novými vlastnostmi, které jsou onkogenní (**Cibula et al., 2009; Snustad & Simmons, 2009; Klener, 2002**). Jako příklad lze uvést translokaci protoonkogenu cyklinu D1 (*ccnd1*) za oblast promotorů genu pro těžké řetězce imunoglobulinů (**Klener, 2002**).

Aneuploidie označuje početní změny chromozomů, které postihují nejčastěji pouze jeden chromozóm. Tato definice zahrnuje také tzv. částečnou aneuploidii, což je delece celého ramene chromozómu. V rámci aneuploidie dále rozlišujeme hypoploidii, kdy chromozóm nebo jeho část chybí, a hyperploidii, při které naopak část nebo celý chromozóm přebývají (**Snustad & Simmons, 2009**). Tato práce se zabývá polyzomií chromozómu 17, tedy hyperploidii chromozómu 17. Podrobnosti o polyzomii tohoto chromozómu budou zmíněny v kapitole nádorové markery.

3.2. GENY MUTOVANÉ V NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH

Geny mutované při vzniku nádorů můžeme rozdělit na protoonkogeny, tumorsupresorové geny (antionkogeny), geny regulující apoptózu a reparační geny.

3.2.1 PROTOONKOGENY

Protoonkogeny jsou geny za normálních podmínek řídící buněčný růst, proliferaci a diferenciaci. Jejich aktivita se mění na úrovni regulace jejich exprese nebo vlivem strukturních změn protoonkogenů (Obr.3). Pro vznik aktivního onkogenu postačuje mutace v jedné ze dvou alel. Takovou změnou protoonkogenu může vzniknout trvalý promitotický signál způsobující rozvoj nádorového klonu.

Onkogeny kódují růstové faktory, receptory pro růstové faktory, faktory kódující nereceptorové kinasy, faktory intracelulární signalizace, transkripční faktory, regulační faktory apoptózy (**Klener, 2002**) a telomerasy (**Nussbaum et al., 2004**).

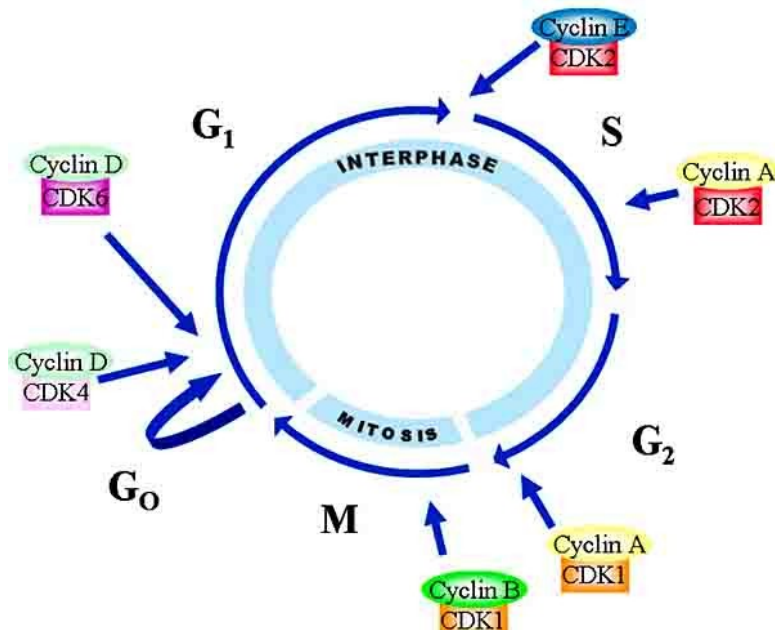
Růstové faktory jsou polypeptidy interagující s receptory celé řady buněk nebo pouze se specifickými buněčnými populacemi. Příkladem růstových faktorů mohou být epidermální růstový faktor (EGF) nebo inzulínu podobný růstový faktor (IGF). Signálně aktivní komplex růstový faktor- receptor ovlivňuje četné funkce buňky jako proliferaci, migraci či diferenciaci. Geny pro růstové faktory bývají v maligních buňkách jen zřídka mutovány. Poruchu promitotické aktivity buněk častěji způsobuje alterace jiných onkogenů, jejichž produkty zvyšují expresi růstových faktorů (**Petruželka et al., 2003**).

Receptory růstových faktorů jsou transmembránové proteiny vážící růstové faktory. V normálních buňkách jsou receptory s navázaným růstovým faktorem rychle inaktivovány, ale v buňkách nádorových může být exprese receptoru zvýšena nebo narušena jeho inaktivace, což vede k prodloužení stimulačního účinku růstového faktoru (**Petruželka et al., 2003**). Mezi onkogeny kodující receptory pro růstové faktory řadíme např. *c-erb-B2 (her-2/neu)* identický s genem kódující receptor pro EGF a TGF- α . Amplifikace *egfr* byla potvrzena např. u rakoviny prsu, ovaria a glioblastomu (**Klener, 2002**).

Do skupiny onkogenů kódujících transkripční faktory patří *myb, myc, jun, rel, src, fos* a další. Transkripční faktory jsou jaderné proteiny, které obsahují DNA-vazebnou doménu pro vazbu na specifický úsek DNA a transaktivační doménu umožňující interakci s dalšími regulačními proteiny. Tyto proteiny aktivují a regulují transkripci (**Klener, 2002; Petruželka et al., 2003**).

Jako nereceptorové kinasy jsou označovány cyklindependentní kinasy (CDK). Úkolem všech CDK je regulace průchodu buňky jednotlivými fázemi buněčného cyklu (Obr.5) (**Koutecký et al., 2004**). Buněčný cyklus, střídání fází G1-S-G2-M, probíhá u dělících se buněk neusále dokola. Naopak terminálně diferenciované buňky se nacházejí v klidovém stavu (tzv. fáze G0), ze kterého už zpravidla nevstupují zpět do buněčného cyklu a před smrtí už se dále nedělí. Výjimkou jsou buňky nádorové. CDK tvoří komplex s cykliny, v němž CDK představuje katalytickou a cyklin pozitivně regulační složku. V jednotlivých fázích cyklu cykliny aktivují příslušnou kinasu, jejich komplex rozpoznává specifické substráty, které následně fosforyluje a tím je aktivuje (popř. deaktivuje). Právě komplex CDK- příslušný cyklin umožňuje postup buňky do další fáze buněčného cyklu, pouze za podmínek, že je na ni buňka dobře připravena. Hladina CDK v buňce je poměrně konstantní, ale hladina jednotlivých cyklinů kolísá. Svého maxima dosahují ve fázi, kdy aktivují příslušnou kinasu a poté jsou rychle degradovány. Příkladem cyklinu je cyklin D, syntetizovaný po stimulaci buňky mitogenním signálem. Cyklin D asociuje s kinasami

CDK4 a CDK6 a zajišťuje průchod G1 fází (Adam et al., 2003; Snustad & Simmons, 2009).

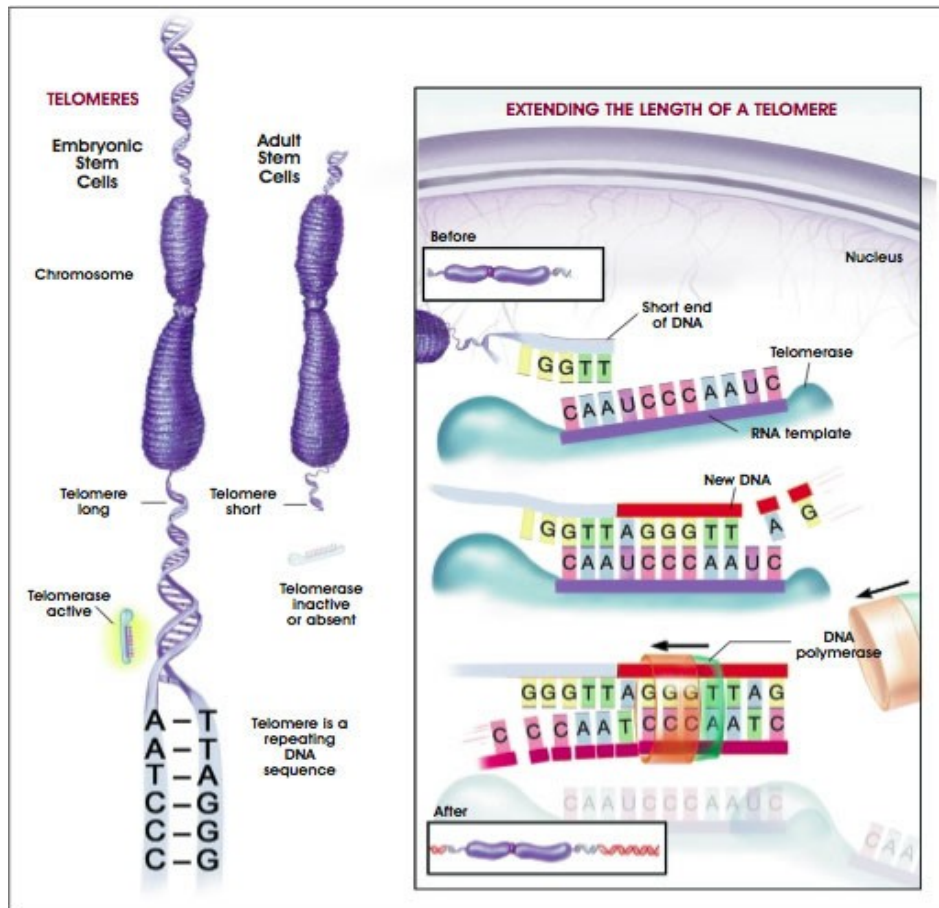


Obr.5: Buněčný cyklus a jeho regulace cyklindependetními kinasami (CDK)

Normálně cyklující buňky prochází čtyřmi hlavními fázemi buněčného cyklu (G₁, S, G₂ a M). Průchod buňky celým cyklem je regulován CDKs (Chin & D’Mello, 2005).

Telomerasa (hTERT) je reverzibilní transkriptasa zodpovědná za prodlužování telomer na konci chromozómů. Z chemického hlediska je telomerasa ribonukleoprotein. Při replikaci DNA během S fáze je pro syntézu komplementárního řetězce k opoždujícímu se řetězci potřeba komplementárních RNA-primerů. Při replikaci řetězce jehož 5'-koncem je telomera, není přítomna žádná DNA, která by mohla sloužit jako templát pro RNA-primery. Díky tomu se telomera při každé replikaci zkracuje, protože opoždující se řetězec se nemůže replikovat od konce chromozómu. Udržet délku telomery během buněčného dělení má za úkol telomerasa, která poskytuje vlastní RNA jako templát pro přidání repetitivní telomerické DNA (Obr.6). Tato sekvence je druhově závislá, u člověka se jedná o sekvenci TTAGGG. Diferenciací buněk během vývoje organismu se funkce telomerasy snižuje, telomery se postupně zkracují o 35 pb za jedno dělení. Nakonec jsou konce chromozómu zkráceny na kritickou mez a jim blízké geny mohou být ve výjimečných případech deletovány. Kritické zkrácení DNA (normální během diferenciacce) způsobí zástavu proliferace a vstup buňky do klidové fáze G₀. Vstup do G₀ fáze zprostředkovává signalizační dráha p53 a Rb1. Nepřítomnost funkce telomerasy se u normálních buněk projevuje neschopností se neomezeně dělit a stárnutím (Nussbaum et al., 2004; Alberts et al., 2002). Telomerasová aktivita je ovlivněna omezenou expresí genu hTERT. V běžných

tkáních je telomerasová aktivita potlačena, aktivovaná je v buněkách, u nichž je zapotřebí intenzivní proliferace např. v kmenových a nádorových buňkách. Ektopická exprese genu pro telomerasu v kombinaci s onkogenní alelou H-Ras a SV40-T může vyvolat přeměnu buňky normální na kancerogenní (Lerebours & Lidereau, 2002).



Obr.6: Telomery a funkce telomerasy

Prodlužování telomer za pomoci telomerasy přidávájí repetitivní sekvenci DNA. Telomerasa se váže ke konci telomery pomocí RNA templátu, který použije pro vytvoření nového vlákna DNA. Telomerasa připojí několik repetitivních sekvencí DNA. Poté DNA polymerasa vytvoří komplementární vlákno k opakující se sekvenci (Bethesda, 2009).

3.2.2. TUMORSUPRESOROVÉ GENY (ANTIIONKOGENY)

Produkty tumorsupresorových genů jsou negativní regulátory buněčného dělení a při jejich expresi dochází k inhibici nádorové transformace (Klener, 2002). Mají však i další funkce, podílí se na řízení diferenciacce, apoptózy a odpovědi na stresové podněty. Objev většiny tumorsupresorových genů je spojen s nalezením genů zodpovědných za dědičná nádorová onemocnění. Při nich dochází k přenosu jedné mutované nebo deletované tumorsupresorové alely. Pro inaktivaci tumorsupresorových genů je nutná mutace či delece

obou alel, ke které dochází během života postiženého jedince. Produkty tumorsupresorových genů jsou transkripční faktory, proteiny regulace buněčného cyklu a apoptózy (Petruželka et al., 2003; Nussbaum et al., 2004). Jako příklad antionkogenu můžeme uvést pRB, p53, *brca1* a *brca2*.

Rb gen se nachází v oblasti 13q14 (Nussbaum et al., 2004). Rb gen kóduje Rb fosfoprotein (pRb), universální regulátor buněčného cyklu, nacházející se v jádrech téměř všech buněk těla (Alberts et al., 2002). Interaguje s regulátory transkripce, proteinkinasami a dalšími promitoticky aktivními molekulami. Za běžných podmínek blokuje vstup buňky z G1 fáze do S fáze, dokud není vše připraveno k proliferaci. Na začátku G1 fáze na sebe naváže E2F transkripční faktory, které uvolňuje až po fosforylaci CDK iniciovanými mitogenními signály. Faktory E2F spouštějí transkripci proteinů nezbytných pro replikaci DNA. Po mitóze je pRB defosforylován, váže E2F a obě buňky vstupují do klidové fáze. Mutace Rb genu způsobuje atypické uvolňování E2F, což usnadňuje přeměnu buňky fyziologické na maligní. Mutace Rb byla zjištěna u retinoblastomu, dále u sarkomu kostí a měkkých tkání (Cibula et al., 2009; Koutecký et al., 2004; Snustad & Simmons, 2009). Zárodečná mutace Rb u hereditárního retinoblastomu se dědí jako dominantní znak (Nussbaum et al., 2004).

Protein p53 je aktivován například poškozením DNA nebo aktivací některých onkogenů. Transkripční faktor p53 reguluje transkripci řady genů mimo jiné i inhibitoru komplexu cyklin/CDK4 nebo cyklin/CDK6 p21 (blokuje vstup buňky do S fáze), proteinu zprostředkovávajícího vlastní odbourání p53 (Adam et al., 2003) p53 dále zvyšuje expresi proteinu bax, důležitého pro indukci apoptózy (Klener, 2002).

Defekty genů *brca1* a *brca2* (Breast CAncer) zodpovídají za zvýšení rizika karcinomu prsu a vaječnicků u mladých žen. Gen *brca1* je odpovědný až za 50% hereditárního karcinomu prsu. Jeho produktem je nukleární fosfoprotein, významný pro diferenciaci epitelu mléčné žlázy (Klener, 2002). Obecně se dá říct o produktech těchto dvou genů, že jsou to proteiny účastníci se transkripce a opravy poškozené DNA .

3.2.3. REGULAČNÍ PROTEINY APOPTÓZY

Mezi vlastnosti charakteristické pro maligní buňky patří nesmrtelnost, té dosahují mutací genů pro regulační proteiny apoptózy. U genů regulujících apoptózu většinou stačí mutace pouze jedné alely. Jako příklad lze uvést gen *bcl-2*, aktivovaný translokací do oblasti genu pro těžký řetězec imunoglobulinů nebo p53 indukované geny (Koutecký et al., 2004).

3.2.4. REPARAČNÍ GENY

Reparační geny kódují proteiny schopné opravy poškozených úseků DNA a tím brání kumulaci genetických změn. K poškození DNA dochází při samotné replikaci nebo vlivem kancerogenů. Poškození reparačních genů se projevuje zvýšenou četností mutací a umožňuje vznik heterogenních nádorových klonů, původně vzniklých z jednoho maligního klonu. K reparačním genům můžeme zařadit už dříve zmiňované geny *brca1* a *brca2* (Koutecký et al., 2004).

4. KLINICKÉ PŘÍZNAKY

V počátečních stádiích je karcinom prsu bezpříznakový, zjistitelný pouze mamograficky. Nádory větších rozměrů se projevují hmatatelnou bulkou v prsu. Dalšími možnými projevy nádoru mohou být změny konfigurace a velikosti prsu, bolestivost prsu, vtažení kůže nebo bradavky, povrchové změny na bradavce, okrsky zarudlé kůže, výtok z bradavky nebo rozšíření žilní pleteně. Při regionálním šíření nádoru dochází ke zvětšení uzlin v podpaží a nadklíčku. Pouze u méně než 10% nemocných se objevují příznaky vzdálených metastáz jako bolesti v kostech nebo hyperkalcemický syndrom při metastazování do kostí (Petruželka et al., 2003).

5. PREVENCE

Prevenici zhoubných nádorů dělíme na primární, sekundární a terciární.

Primární prevence zahrnuje minimalizaci vnějších faktorů způsobujících nádorové bujení a tím snížení incidence. Dodržování jakýchkoli zásad primární prevence by však nevedlo k úplné eliminaci nádorových onemocnění z lidské populace (Adam et al., 2003).

Cílem sekundární prevence je snížit počet úmrtí zapříčiněných rakovinou, její včasnou diagnostikou a tím zvýšit pravděpodobnost úplného vyléčení pacientů (Adam et al., 2003). Zahrnuje samovyšetření a onkologický screening. Se samovyšetřením by měly ženy začít ve věku 20 let a měly by ho provádět jednou měsíčně nejlépe 7. až 8. den po skončení menstruace. Každé 3 roky nebo v případě zjištění abnormality v prsu se ženám doporučuje docházet k lékaři na celkové fyzikální vyšetření (Petruželka et al., 2003). Pro lékaře je nezbytná znalost rodinné a osobní anamnézy pacienta. Fyzikální vyšetření se zaměřením na prsy se skládá z tzv. vyšetření pohledem, kdy si lékař všímá vnějších projevů nádoru prsu jako je symetrie prsů, souhybů s dýcháním, rozšíření žilní pleteně, stavu bradavek a kůže. Lékař dále pohmatem vyšetřuje prsy a palpačně kontroluje podpažní, podklíčkové a nadklíčkové uzliny (Klener, 2002). Onkologický screening u rakoviny prsu zahrnuje preventivní mamografické vyšetření, jímž je zjistitelná preklinická fáze nádoru a má také mimořádný význam pro detekci recidivy. Preklinická fáze začíná první reprodukcí nádorových buněk a končí nástupem prvních klinických symptomů (Adam et al., 2003).

Mamografie v rámci screeningu umožňuje zjistit tzv. minimální karcinomy (maximální velikost 10 mm), neinvazivní a invazivní karcinomy (**Pavlišta et al, 2008**). Diagnostikování karcinomu prsu v preklinické fázi výrazně zlepšuje prognózu pacientek. Vhodným doplněním mamografického vyšetření je vysoce senzitivní ultrasonografie umožňující rozlišení cystické a solidní složky nádoru (**Klener, 2002**).

Terciární prevence zahrnuje opatření snižující úmrtnost u onkologických pacientů s absolvovanou primární léčbou (**Adam et al., 2003**).

6. ROZDĚLENÍ TUMORŮ PRSU

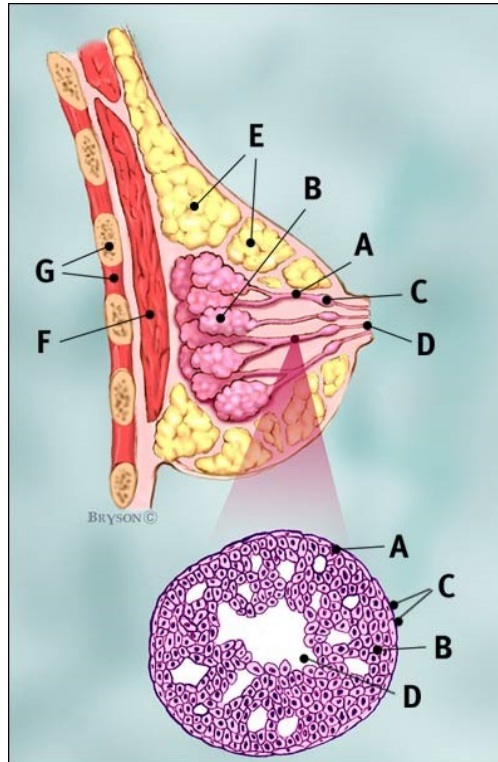
Nádory (neoplasmata) dělíme na nádory maligní a benigní. Nádory benigní nemetastazují a neohrožují život pacienta. Naopak nádory maligní nekontrolovatelně rostou, prorůstají do okolních tkání a šíří se do vzdálenějších částí těla pomocí lymfatických a mizních cév (metastazují). Metastázy jsou sekundární nádory vznikající množím původních rakovinných buněk a napadáním tkání v jiných částech organismu. Podle původu nádorových buněk lze novotvary dělit na sarkomy, vznikající z mezenchymatické tkáně jako je např. kost, sval či vazivo, karcinomy vycházející z epitelů a konečně na hematopoetické a lymfoidní malignity jako leukémie a lymfomy šířící se v kostní dřeni, lymfatickém systému a periferní krvi (**Nussbaum et al., 2004**). Jelikož se dále budeme zabývat nádory prsu, budeme hovořit obecně o karcinomech, které tvoří okolo 80% lidských nádorů. Důvodem může být jejich časté vystavování vnějším faktorům zvyšujících riziko vzniku nádoru a navíc většina proliferujících buněk v dospělém organismu jsou právě buňky epitelia (**Alberts et al., 2002**).

6.1. ANATOMIE PRSU, PŘEDEVŠÍM MLÉČNÉ ŽLÁZY

Mléčná žláza, lokalizovaná na přední straně hrudního koše mezi 2. a 5. žebrem, je epidermálního původu a jedná se o derivát potní žlázy. Vlastní žláznaté těleso se nachází mezi povrchovou a hloubkovou facií, mezi nimi probíhají Cooperovy vazy, které fixují kůži a dvorec a spolu se submamární rýhou vytváří typický tvar ženského prsu. Mléčná žláza se skládá z 15-20 laloků, jejichž vývody ústí na povrchu bradavky. Před pubertou se prsní žláza skládá především ze stromovitého komplexu duktů a malého množství vaziva. Až vlivem pohlavních hormonů se zmnožuje vazivově-tuková tkáň, dochází k prodloužení duktů a tvorbě lalůčků. Během těhotenství a nástupem laktace se žláza terminálně diferencuje.

Terminální duktolobulární jednotka je základní hormonálně senzitivní jednotkou mléčné žlázy. Tato jednotka je tvořena alveolární (luminární) epitelovou vrstvou a zevní myoepiteliální vrstvou ohraničenou bazální membránou. Z vnější strany ji obklopují elastická vlákna a kolagenní vazivo, popř. hormonálně senzitivní stroma. Alveolární

epitelová vrstva je tvořena buňkami cylindrickými (luminální) a bazálními schopnými diferenciace na buňky cylindrické i myeloepitelové. Podle typu původních buněk můžeme karcinomy rozdělit na luminální a bazální. Z bazálních buněk se mohou vyvinout různé druhy premaligních lézí nejprve pozorovatelných jako hyperplastický dilatovaný lobulus. Následnou proliferací epitelu vzniká duktální (nebo lobulární) hyperplasie a dalším vývojem a expanzí vzniká low-grade duktální karcinom *in situ* (DeVita et al., 2008; Pavlišta et al., 2008).



Obr.7: Anatomie prsu

Anatomie prsu: A- dukty, B- lobuly, C- dilatovaná část ductu zadržující mléko, D- prsní bradavka, E- tuková tkáň, F- sval pectoralis major, G- hrudní koš

Anatomie ductu: A-normální buňky ductu, B- tumorové buňky ductu, C-bazální membrána, D- lumen (centrum ductu) (www.natural-disease-solutions.com/breast-cancer-information.html).

6.2. SPORADICKÉ KARCINOMY PRSU

Sporadické karcinomy prsu vznikají akumulací získaných mutací somatických genů. Zvýšené riziko sporadických nádorů prsu je často spojeno se zvýšenou expozicí pohlavním hormonům (Kenemans et al., 2004).

6.2.1. KARCINOM *IN SITU*

Duktální karcinom *in situ* (DCIS) vzniká proliferací transformovaných epitelových buněk duktálního systému a neproniká bazální membránou do periduktálního stromatu. Na mamografii bývají patrné kalcifikace. Tento typ karcinomu je častější u žen po menopauze a často recidivuje. DCIS bývá nejčastěji léčen operativním odstraněním tumoru (tumorektomie) a následnou radioterapií či chemoterapií.

Lobulární karcinom *in situ* (LCIS) vzniká proliferací uniformních malých buněk epitelu lobulů mléčné žlázy, způsobuje jejich roztažení. Na rozdíl od DCIS není detekovatelný mamograficky. Často je multicentrický a v 10-20% postihuje oba prsy. Jedná se o druh karcinomu běžnějšího u premenopauzálních žen. Pro tento typ karcinomu je typický PR/ER pozitivní a *her-2/neu* negativní status spolu se sníženou expresí E-kadherinu, molekulou epiteliální membrány pro adhezi mezi buňkami. Při tomto typu karcinomu je indikována chemoterapie a pro absolutní snížení rizika postižení i druhého prsu je doporučována oboustranná mastektomie (**DeVita et al., 2008; Klener, 2002; Vyzula et al., 2004**).

6.2.2. INVAZIVNÍ FORMY KARCINOMU PRSU

Mikroinfiltrativní karcinom proniká bazální membránou do maximální vzdálenosti 2 mm.

Invazivní duktální karcinom tvoří přibližně 75% všech karcinomů prsu. Je patrný i palpačním vyšetřením, neboť ho provází reaktivní fibróza, způsobující kamennou tvrdost nádoru. Metastazuje do kostí, jater a plic. Mezi méně časté formy duktálního karcinomu řadíme karcinomy tabulární, medulární (PR a ER-), koloidní, papilární (ER+ s dobrou prognózou) a komodo-typ (**DeVita et al., 2008; Klener, 2002**).

Invazivní lobulární karcinom představuje přibližně 10% karcinomů prsu. Ze 30% je bilaterální. Metastazuje do serózní membrány, mozkové a míšní pleny, vaječnicků a do retrioperitonea (prostor mezi nástěnnou pobřišnicí a zadní stěnou břišní) (**DeVita et al., 2008; Klener, 2002**).

Inflamatorní karcinom je nejagresivnější formou karcinomu prsu. Infiltruje celý prs a projevuje se difuzním zarudnutím kůže, otokem a zatvrdnutím kůže, která má vzhled pomerančové kůry. Vyznačuje se rychlým růstem, častým metastazováním a z 50% postihuje i druhý prs. Z histologického hlediska se jedná o málo diferencovaný duktální karcinom ER/PR negativní, se zvýšenou expresí *her-2/neu* a mutací *tp53* (**DeVita et al., 2008; Klener, 2002**).

6.3. HEREDITÁRNÍ KARCINOMY PRSU

Hereditární karcinom prsu se vyskytuje na základě mutace genů v zárodečných buňkách. Jedná se především o geny *brca1* a *brca2*, které jsou mutované ve 2-3% tumorů prsu a u přibližně 30-40% familiárních nádorů prsu (**Kenemans et al., 2004**). *brca1* pozitivní tumory jsou převážně ER/PR a Her-2/neu negativní (triple negativní) a mají špatnou prognózu (**Lakhani et al., 2002**). Hereditární karcinom postihuje většinou ženy před menopauzou. Tento typ karcinomu vzniká neoplastickou transformací bazálních buněk, bývá málo diferenciováný a větší velikosti, většinou se jedná o invazivní duktální karcinom s častými metastázami v uzlinách. Tento subtyp má špatnou prognózu a krátkou dobu přežití, často metastazuje do měkkých tkání a centrální nervové soustavy. Více než polovina těchto nádorů metastazuje nejprve do mozku (**Zaha et al., 2010**).

7. DIAGNOSTIKA

Pro diagnostiku je rozhodující preventivní vyšetření u lékaře a v mamografických centrech, kde dochází k prvotnímu zjištění nádoru prsu. Dalšími zobrazovacími metodami používanými při diagnostice nádorů prsu jsou počítačová tomografie (posouzení změn v okolí malignity, odhalení metastáz) a magnetická rezonance (vyločení existence více ložisek nádoru při záchovných operacích, odhalení mozkových metastáz) (**Klener, 2002**).

U pacientů s nádory jsou prováděna také biochemická vyšetření se zaměřením na nádorové markery, jejichž výskyt je zjišťován v tělních tekutinách, tzv. humorální nádorové markery, a v nádorové tkáni, kdy se jedná o molekuly vyskytující se v nádorových buňkách nebo na jejich povrchu-celulární tumorové markery. Nádorové markery jsou převážně proteiny související s růstem nádoru v organismu. Jedná se o molekuly produkované nádorem (asociované tumorové markery) nebo molekuly, jejichž produkce je v tkáních organismu indukována nádorem (indukované nádorové markery). Analýza většiny nádorových markerů není kvůli své nízké diagnostické senzitivitě a specifitě vhodná pro screening ani pro primární diagnostiku nádorů, ale používá se pro monitorování průběhu choroby a účinnosti terapie a pro určení stádia nádoru a prognózy. Zvýšení hladiny tumorových markerů může signalizovat návrat nemoci nebo neúčinnost léčby (**Koutecký et al., 2004; Racek et al., 2006**).

7.1. TUMOROVÉ MARKERY U RAKOVINY PRSU

Mezi tumorové markery sledované u pacientů s rakovinou prsu patří: CA 15-3, CEA, TPA, exprese hormonálních receptorů a další.

7.1.1. CA 15-3

CA 15-3 je onkofetální mucinový glykoprotein bez orgánové specifity. Produkují ho především nádory žlázo­vého epitelu a epitelu mléčné žlázy. Jeho stanovení se používá k posouzení účinnosti léčby, předpovědi recidivy u pacientů s rakovinou prsu. Procento pozitivního CA 15-3 stoupá s progresí nádoru a přímo koreluje se stádiem choroby. Zvýšené hodnoty CA 15-3 mívají pacienti s nádorem dělohy, ovarií, zvýšená produkce je pozorována rovněž u pacientů s hepatopatií, plicními chorobami, renálním selháním nebo u těhotných žen (**Koutecký et al., 2004; Racek et al., 2006**).

7.1.2. Karcinoembrionální antigen (CEA)

CEA je glykoprotein sekretovaný buňkami střeva ve fetálním období, ovlivňuje buněčnou adhezi. Jeho zvýšená hladina nemusí být zapříčiněna pouze nádorovými onemocněními prsu, kolorekta nebo plic, ale například i cirhózou jater. Pokles hodnot CEA signalizuje úspěšné chirurgické odstranění nádoru, efekt chemoterapie nebo radioterapie (**Koutecký et al., 2004; Racek et al., 2006**).

7.1.3. Tkáňový polypeptidový antigen (TPA)

TPA řadíme mezi proliferační tumorové markery. Je prokazatelný ve všech buňkách epiteliálního původu. Jedná se o směs fragmentů různého druhu cytokeratinů, tvořících intermediální filamenta fyziologických i nádorových buněk. TPA je indikátorem buněčné proliferace, zvýšená hladina TPA se nachází u rychle rostoucích nádorů. S účinnou terapií a zastavením buněčného růstu klesá koncentrace TPA mnohem nápadněji než koncentrace ostatních markerů. K falešnému zvýšení může dojít vlivem zánětlivých onemocnění plic, jater a urogenitálního traktu (**Racek et al., 2006**).

7.1.4 Estrogenové receptory (ER)

Gen pro ER- α je lokalizovaný v 6q25.2-q27 regionu, který bývá u karcinomu prsu často deletován. Inaktivace ER má poté za následek neúčinnost endokrinní terapie (**Lerebours & Lidereau, 2002**). Gen pro ER- β se nachází v oblasti 14q22-q24 (**Kenemans et al., 2004**). ER jaderné receptory jsou nezbytné pro růst a diferenciaci epitelů prsních žláz. V jádře buněk prsní tkáně můžeme najít dva typy estrogenových receptorů ER- α a ER- β . Při fyziologickém růstu prsní žlázy působí estrogeny na ER-pozitivní buňky prostřednictvím komplexu estrogen-ER (Obr.9-1). Tento komplex aktivuje mimo jiné produkci progesteronových receptorů a růstového faktoru, který stimuluje růst sousedních ER-negativních buněk. Zvýšená exprese ER- α už v premaligních lézích je spojená s intenzivní proliferací. Exprese ER- β je naopak v premaligních lézích nižší než v normálním epitelu. Předpokládá se tedy, že ER- β může mít v maligní progresi funkci supresoru (**Hopp &**

Fuqua, 2003). Podíl ER na inhibici či aktivaci růstu nádoru prsu nezávisí příliš na typu ER, ale na situaci uvnitř buňky. Inhibiční efekt je spojen se sníženou hladinou ER- α , nižší expresí cyklinu D1 a zvýšenou expresí PR stejně jako Bax/BCL-x1 (**Soldati et al., 2009**).

ER status je určován pomocí ligand vazebných testů a imunohistochemicky. Hlavním účelem analýzy je identifikace pacientek, u nichž je vysoká pravděpodobnost účinnosti léčby antiestrogeny, např. tamoxifen a toremifén. Se zvyšující se expresí ER v tkáni roste odpověď na hormonální léčbu, u pacientek v relapsu účinnost terapie znatelně klesá. Téměř 70% tumorů prsu je ER-pozitivní, u starších pacientek je pozitivní nález častější. ER-pozitivní tkáně jsou většinou dobře histologicky diferenciované s absencí mutací nebo amplifikací genů jako *tp53*, *her-2/neu* a *egfr*. ER-pozitivní tumory inklinují k metastazování do kostí, měkkých tkání a reprodukčních orgánů na rozdíl od ER-negativních s nejčastějšími metastázami do jater a mozku. ER-pozitivní pacientky mají nižší pravděpodobnost výskytu relapsu během pětiletého přežití (**Hopp & Fuqua, 2003**). ER a PR pozitivní tumory jsou luminální nádory, dělí se na subtyp A (*her-2/neu* negativní) a B (*her-2/neu* pozitivní). Z valné části se jedná o invazivní duktální karcinomy. Subtyp A je častější než subtyp B, s intenzivní expresí ER a PR, v nižším stádiu (I-II) se tvoří dobře či mírně diferenciované léze. Luminální subtyp B má nižší expresi ER a PR. Je tvořen dediferenciovanými buňkami a častěji napadá uzliny (**Zaha et al., 2010**).

ER je heterodimer, jehož geny bývají velmi často postiženy především delecemi nebo bodovými mutacemi (**Hopp & Fuqua, 2003**). Jako příklad lze uvést záměnu lysinu 303 za arginin na začátku vazebné domény ER- α pro estrogen, mutace zvyšuje citlivost nádorových buněk k estrogeneru. Tato mutace se vyskytuje přibližně u 30% premaligních lézí (**Fuqua et al., 2000**).

V neoplastických i normálních ER-citlivých tkáních podléhají oba ER geny dodatečnému alternativnímu sestřihu za vzniku variant mRNA ER- α a ER- β s chybějícím jedním či více exony. Tyto varianty mRNA jsou exprimovány společně s normálními geny pro receptory, ale předpokládá se, že míra exprese pozměněných mRNA variant ER- α může hrát roli v tumorogenezi. Polymorfismus a missense mutace ER- α genu byly nalezeny v primárních a metastazujících prsních nádorech. Nemají však souvislost s klinickými parametry jako jsou velikost nádoru nebo histologie (**Hopp & Fuqua, 2003; Pavlišta et al., 2008**).

7.1.5. Progesteronové receptory (PR)

PR se nachází ve dvou isoformách PR-A a PR-B, jejich expresi pozorujeme nejčastěji v buňkách obsahujících také ER- α , jsou pozitivně regulovány estrogenerem. Na rozdíl od ER- α a ER- β , PR-A a PR-B jsou koexprimovány v podobné hladině uvnitř stejných epidermálních buněk. Rovnováha receptorových isoform je rozhodující pro

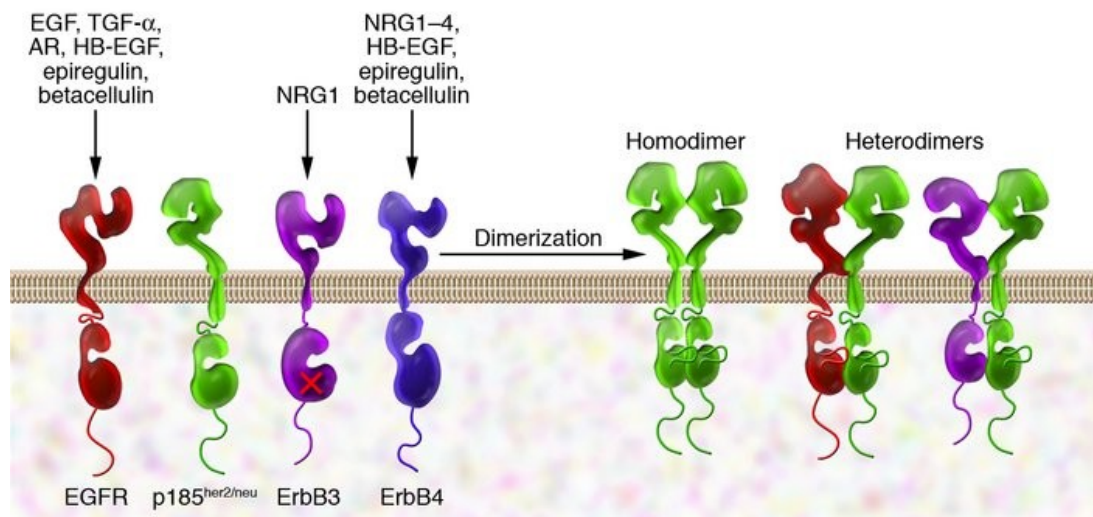
progesteronovou citlivost normální prsní tkáně. Poměr PR-A ku PR-B bývá 1:3. Ztráta koordinace zastoupení isoform vede k tumorogenezi, nachází se až u 30% atypických duktálních hyperplasií a u více než 50% duktálních karcinomů *in situ* (Hopp & Fuqua, 2003).

K expresi PR regulovaných genů dochází vlivem mnoha extra- a intra-celulárních procesů. PR je ligandem aktivovaný transkripční faktor na promotorech obsahujících sekvenci citlivou na progesteron jako v případě genu *c-myc* (Moore et al., 1997). PR může aktivovat genovou expresi také interakcí s dalšími transkripčními faktory jako AP1, SP1 nebo STATs nebo spustí kinasovou kaskádu (MAPK, c-Src kaskády), kterou aktivuje jiné transkripční faktory (Daniel et al., 2009).

PR status zjišťujeme pomocí ligand vazebných testů, antibody-based testů a imunohistochemicky. Tyto testy však nejsou schopny rozlišit jednotlivé isoformy receptoru. Prediktivní a prognostický význam PR je podobný jako u ER. PR pozitivní karcinomy prsu bývají častěji dobře diferenciované. PR-pozitivní pacientky lépe odpovídají na tamoxifen, mají delší interval do selhání léčby a delší celkovou dobu přežití (Hopp & Fuqua, 2003).

7.1.6. *her-2/neu* (*c-erb-2*, *ErbB2*)

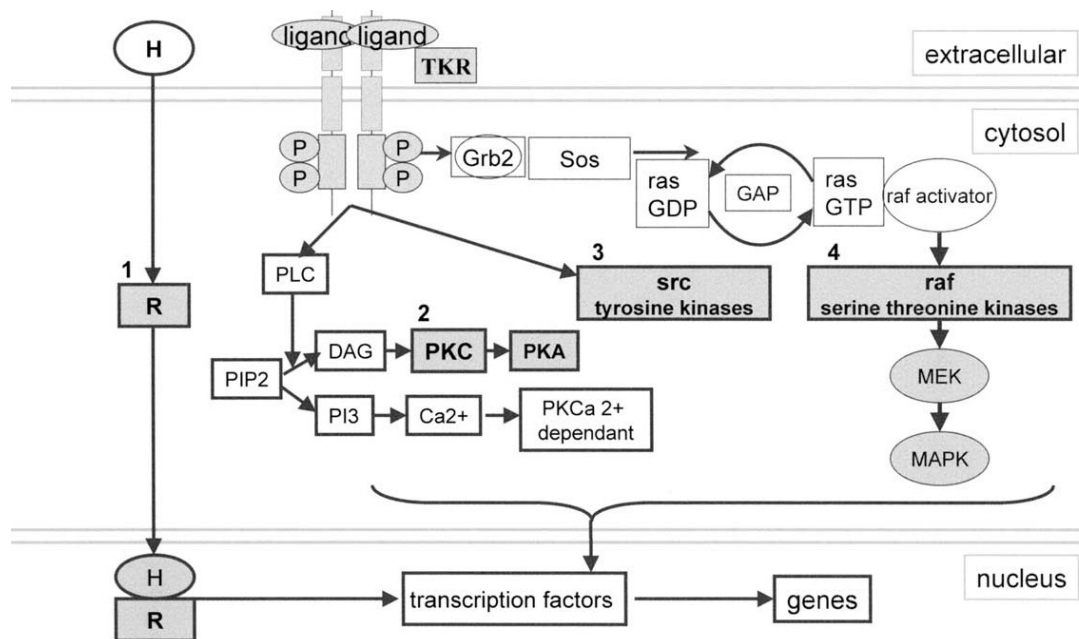
Gen pro lidský epidermální růstový faktor 2 (*her-2/neu*) je lokalizovaný na chromozómu 17q. Gen kóduje 185 kDa velký transmembránový glykoprotein p185^{HER 2} s tyrosinkinasovou aktivitou (Ross et al., 2003). *Her-2/neu* kódovaný protein patří do HER rodiny růstových faktorů zahrnující mimo HER-2 strukturálně podobné receptory EGFR (ErbB1, HER-1), HER-3 (ErbB3) a HER-4 (ErbB4). Tyto receptory se skládají ze tří specifických domén - extracelulární vazebné domény, transmembránové domény a intracelulární domény s tyrosinkinasovou aktivitou (Dean-Colomb & Esteva, 2008). HER receptory zprostředkovávají transdukcii signálu (Obr.9), která ovlivňuje buněčnou proliferaci, diferenciaci, přežití, hybnost a adhezi. Pro aktivaci HER-2/neu receptoru je nezbytná přítomnost ligandu, po jehož navázání dimerizuje receptor s identickým receptorem (homodimerizace) nebo jiným příslušníkem HER rodiny (heterodimerizace) (Obr.8). Po dimerizaci dojde fosforylaci specifického intracelulárního tyrosinového rezidua, následně jsou aktivovány signální dráhy. Druh aktivované dráhy závisí na dimerizačním partnerovi a vázaném ligandu, pro HER-2/neu zatím nebyl identifikován žádný ligand (Cibula et al., 2009; Ross et al., 2003).



Obr.8: ErbB (HER) receptory a jejich ligandy.

Všechny receptory HER rodiny mají vysoce homologní extracelulární a kinasovou doménu. Pouze HER3 nemá aktivní kinasovou doménu. HER receptory nejčastěji dimerizují s HER-2/neu, pro který jako jediný dosud nebyl nalezen žádný ligand (**Zhang et al., 2007**).

Aktivované HER receptory spouští signální dráhy zahrnující Ras/mitogeny aktivované kinasy, Janusovy kinasy/ přenašeč signálu a aktivátor transkripce (**Ross et al., 2003**). HER-2/neu spouští signalizaci prostřednictvím fosfatidylinositol-3kinasy a AKT, která může fosforylací aktivovat řadu substrátů. Následuje snížení exprese cyklinu D1 a snížení transkripce p27, což je inhibitor CDK2, to může vést ke zvýšené proliferaci a přežití. Druhou dráhou spuštěnou aktivací HER-2/neu receptoru je tzv. MAPK (mitogenem aktivovaná protein kinasa). MAPK kaskáda je regulována především MEK (kinasaMAP kinasy) a MAPK, což jsou nezbytné komponenty pro buněčný růst. V *her-2/neu* pozitivních karcinomech prsu je aktivována právě Ras/MAPK signalizační dráha (**Dean-Colomb & Esteva, 2008**).



Obr.9: Schematické znázornění 4 možností transdukce signálu

1- Signál je přenášen prostřednictvím hormonu. Hormon se váže na specifický receptor v cytoplasmě a komplex hormon-receptor aktivuje transkripční faktory.

2, 3, 4- Ligand vazbou na extracelulární doménu aktivuje tyrosin kinasový receptor. Následují 3 možnosti dalšího přenosu signálu, které v konečné fázi vedou k aktivaci transkripčních faktorů a expresi specifických, danou dráhou regulovaných proteinů (**Lerebours & Lidereau, 2002**).

Amplifikace či nadměrná exprese Her-2/neu je pozorována přibližně u 30 % případů rakoviny prsu (**Cibula et al., 2009; Ross et al., 2003; Shackney et al., 1998**). Vyšší exprese je nejčastěji nalezena v invazivních duktálních karcinomech prsu a duktálních karcinomech *in situ* comedo-typu. Amplifikace vedek zvýšení počtu homodimerů HER-2/neu, což vedek nadměrné stimulaci signální dráhy. Amplifikace HER-2/neu se velmi často nachází u nádorů prsu v pokročilém stádiu (nejčastěji histologický grade III), s minimální expresí PR a ER, aneuploidií, vysokou intenzitou proliferace, mutací p53, amplifikací topoisomerasyII α a změnami v koncentracích molekulárních markerů invazivity a metastazování rakoviny prsu (**Garcia et al., 1989; Ross et al., 2003**). Tyto nádory jsou málo diferenciované a poměrně často zasahují podpažní lymfatické žlázy (**Zaha et al., 2010**).

Her-2 pozitivita je také spojena se zvýšenou angiogenezí, která je nezbytná pro přežití tumoru a jeho metastazování. HER-2/neu má schopnost měnit rovnováhu mezi proangiogeny a antiangiogeny. V nádorech s nadměrnou expresí HER-2/neu byla pozorována vysoká hladina proangiogenů např. VEGF. V cytosolu buněk se zvýšenou expresí VEGF byla nalezena zvýšená denzita kapilár. Dá se tedy předpokládat, že zvýšená

hladina VEGF přispívá ke vzniku agresivního fenotypu nádorů s nadměrnou expresí HER-2/neu (**Dean-Colomb & Esteva, 2008**).

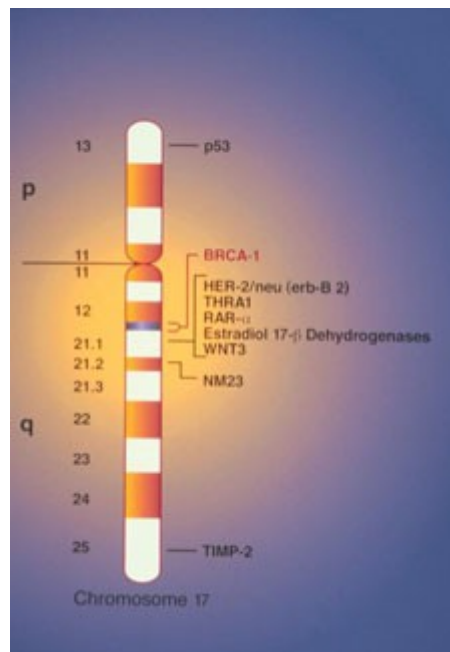
K zjištění *her-2/neu* statusu a určení odpovědi na léčbu trastuzumabem se používají nejčastěji imunohistochemické metody a fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Za *her-2/neu* pozitivní jsou považovány vzorky imunohistochemicky hodnocené jako 3+, resp. 2+ (nutno potvrdit jinou metodou) a při FISH jsou jako vzorky amplifikované označeny ty, jenž mají poměr počtu kopií genu *her-2/neu* ku počtu kopií chromozómu 17 větší nebo roven 2,2 (**Carlson et al., 2006**). Pacientkám s nadměrnou expresí HER-2/neu receptoru je indikována léčba monoklonální protilátkou trastuzumab (obchodní název Herceptin), která se váže na extracelulární část HER-2/neu (**Ross et al., 2003**). Blokadí HER-2/neu způsobuje Herceptin změny v regulaci buněčného cyklu a apoptózy. Herceptin inhibuje shlukování buněk, snižuje expresi cyklinu D1 a hladinu p27 (inhibuje aktivitu cdk2 a proliferaci) v *her-2/neu* amplifikovaných buňkách tumoru prsu. Tento efekt je spojen s inhibicí PI3K aktivity a funkce AKT (**Yakes et al., 2002**). Trastuzumab je používán od roku 2001 k paliativní terapii recidivujících nádorů, pokročilé metastatické nemoci (**Ross et al., 2003**). V roce 2008 byl trastuzumab v České republice schválen pro adjuvantní terapii *her-2/neu* pozitivního časného karcinomu prsu. V souvislosti s přechodem trastuzumabu do adjuvantní léčby došlo v České republice k vytvoření 6 laboratoří prediktivní onkologie, ve kterých je mimo jiné status genu *her-2/neu* vyšetřován. Na základě výsledků těchto laboratoří lze trastuzumab pro léčbu karcinomu prsu a karcinomu žaludku (od roku 2008) indikovat (**www.linkos.cz, 2010**). Co se týče účinnosti léčby, trastuzumab v mono či kombinované terapii, podávaný v první linii léčby, prodlužuje celkovou léčebnou odpověď, interval do progresu choroby a celkovou dobu přežití se snížením rizika úmrtí pacienta o 20%. Téměř u 15% pacientů s primárním karcinomem prsu, adjuvantně léčených chemoterapeutiky s trastuzumabem, se vyvine sekundární nádor a až 60% pacientů s *her-2/neu* pozitivním metastazujícím nádorem na léčbu trastuzumabem neodpovídá. Současný výzkum se snaží objasnit mechanismus této rezistence a zjistit jak tyto mechanismy obejít, aby se zvýšila účinnost trastuzumabu či najít takové léčebné postupy, které by byly u resistantních pacientek účinné (**Dean-Colomb & Esteva, 2008**;).

7.1.6.1. Polyzomie chromozómu 17

Na chromozómu 17 (CH17) je lokalizována řada onkogenů a tumorsupresorů včetně *her-2/neu*, *brca1*, *tp53* (**Lerebours & Lindereau, 2002**) a gen pro topoizomerasu II α (**Beser et al., 2007**).

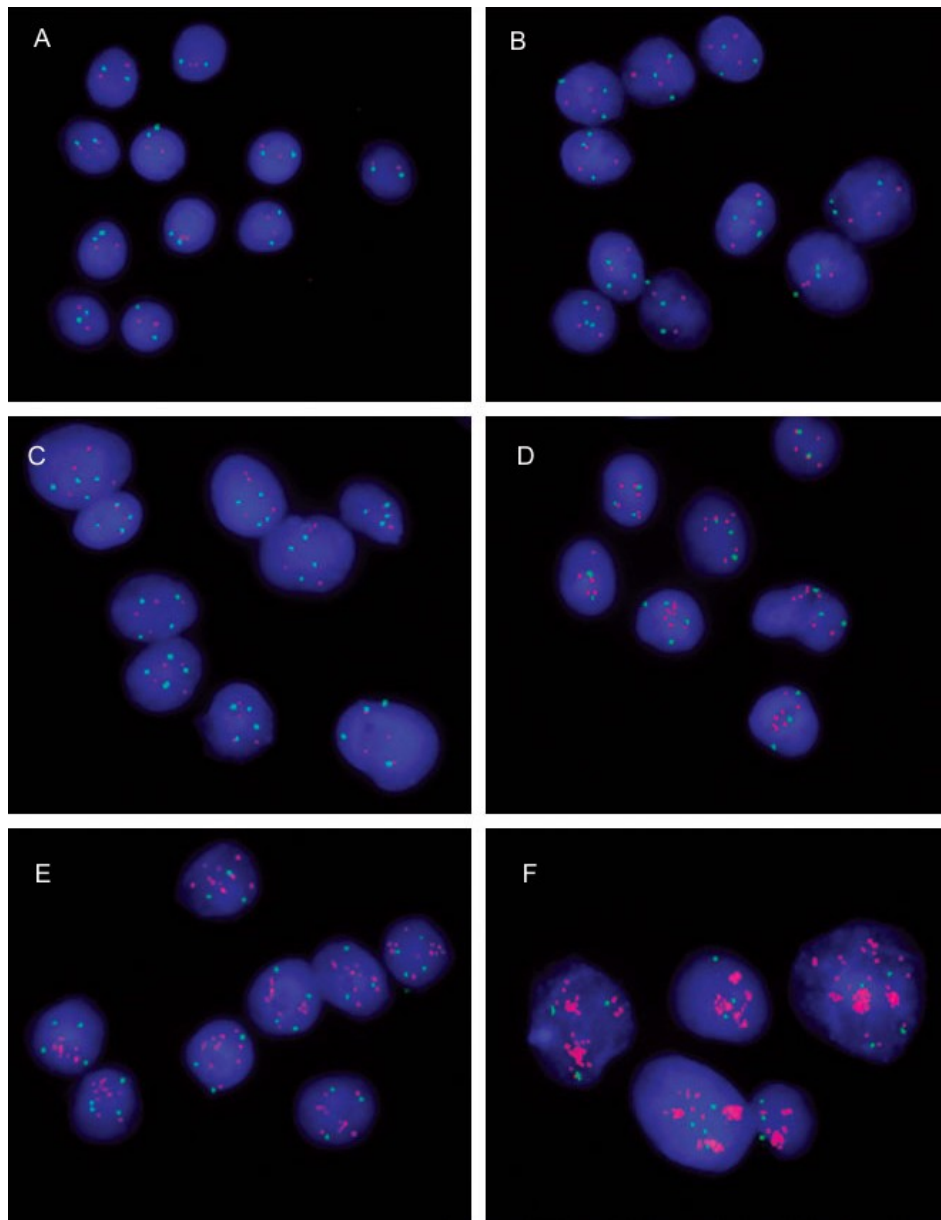
Většina studií považuje zvýšený počet kopií chromozómu 17 bez *her-2/neu* amplifikace u tumoru prsu za poměrně běžný jev (**Viale, 2008**; **Vanden Bempt et al., 2008**), ale výzkum **Marchiò et al. z roku 2009** uvádí, že skutečná polyzomie CH17 je spíše

vzácností a počet signálů CEP17 vyšší než 3 zjištěný pomocí FISH je často způsoben amplifikací nebo zmnožením centromerické oblasti, popř. cross-hybridizací centromerické sondy na centromeru jiného chromozómu. Nesprávná FISH klasifikace tumoru prsu jako polyzomického může být zodpovědná za část kontraindiktivních odpovědí na léčbu trastuzumabem u pacientů falešně HER-2/neu negativních (Viale, 2008). Z tohoto důvodu jsou pacienti s polyzomií CH17, stanovenou pomocí centromerické sondy (CEP17), vyšetřeni lokusově specifickou sondou na oblast 17p11.2. Falešně polyzomické pacienty se tak snažíme odlišit od polyzomických.



Obr.10: Lokalizace onkogenů a antionkogenů na chromozómu 17 (Chedwick, 2001)

Míra výskytu polyzomie CH17 závisí na definici polyzomie. Podle ASCO/CAP je polyzomie definovaná jako výskyt alespoň tří signálů CEP17 na buňku ve $\geq 30\%$ jader (Viale, 2009). Polyzomie chromozómu 17 se vyskytuje v 13 až 46% nádorů prsu, výsledky jednotlivých studií se liší v závislosti na studované populaci a definici polyzomie. Zmnožení počtu chromozómu 17 způsobuje zvýšení počtu kopií genů na něm lokalizovaných, což by mělo vést k nadměrné expresi produktů genů. Polyzomie CH17 nezpůsobuje výraznou nadměrnou expresi HER-2/neu proteinu ani jeho mRNA, je však důležitá při interpretaci HER-2/neu statutu a to především u IHC výsledků 2+ (Vanden Bempt et al., 2008).



Obr.11: Ilustrativní FISH *her-2/neu* v interfázních jádrech tumoru prsu.

A - diploidní jádra, B - trizomie CH17, C - tetrazomie CH17, D - nízká amplifikace *her-2/neu*, E - jádra se střední amplifikací *her-2/neu*, F - vysoká amplifikace *her-2/neu* (**Espinosa et al., 2003**).

Polyzomie CH17 a nadměrná exprese *her-2/neu* u tumoru prsu jsou dvě odlišné genetické aberace s různými klinicko-patologickými významy. Protože polyzomie může odrážet aneuploidii a zvýšenou chromozomální nestabilitu, dalo by se očekávat, že tumory s polyzomií budou agresivnější. Tumory s polyzomií CH17 se charakterem blíží *her-2/neu* negativním nádorům, které mají vyšší grading, sníženou bezpříznakovou dobu přežití,

špatnou prognózu a často jsou ER/PR negativní. Na karcinomy prsu s polyzomií CH17 by se mělo pohlížet spíše jako na *her-2/neu* negativní (Vanden Bempt et al., 2008).

7.1.7. Receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR, ErbB1, HER-1)

EGFR patří do HER rodiny transmembránových receptorů. Lokalizace jeho genu je 7q12. Produktem genu je glykoprotein o velikosti 170 kDa s důležitou rolí v buněčné proliferaci, migraci a regulaci apoptózy. Tyto účinky mají za důsledek špatnou prognózu pacientů s nadměrnou expresí EGFR (Čížková et al., 2009). EGFR je receptor s tyrosinkinasovou aktivitou, který dimerizuje s dalšími členy HER rodiny (stejně jako HER-2/neu) po vazbě jednoho z několika možných extracelulárních ligandů (Obr.8.). Aktivovaný receptor generuje mitogenní signál pomocí Ras/MAP kinasové dráhy, ta iniciuje transkripci cílových genů (Obr.9). Her-2/neu dimerizovaný s EGFR generuje ještě efektivnější mitogenní signál než EGFR nebo Her-2/neu homodimer. Krátce po vazbě ligandu na receptor nastává endocytóza receptoru a jeho následná degradace v lysozómu (Shackney et al., 1998; Tikhomirov & Carpenter, 2003). U nádorů s mutací EGFR k degradaci v lysozómu často nedochází a receptor zůstává déle aktivní. V rámci jedné buňky bývá počet *her-2/neu* zpravidla vyšší než genů pro EGFR (Shackney et al., 1998).

7.1.8. p53

p53 je 53 kDa velký protein kódovaný tumorsupresorovým genem *tp53* nacházejícím se na krátkém rameni chromozómu 17 (Pavlišta et al., 2008). Protein p53 patří k nejdůležitějším tumorsupresorovým genům. p53 tumorsupresorová dráha je inaktivována u přibližně 70% všech typů nádorů. Jeho funkcí je regulace buněčného cyklu, apoptózy a udržení genetické stability (Drissi et al., 2001). p53 je transkripční faktor skládající se z N-koncové transkripčně aktivační domény, centrální DNA-vazebné domény a C-koncové homooligomerační domény. Většina mutací postihuje DNA-vazebnou doménu, snižují nebo znemožňují specifickou vazbu p53 na DNA a tím i transkripci p53 regulovaných genů. V případě mutace oligomerizační domény polypeptidu dochází k tvorbě tetrameru mutovaného p53 s wt-p53. Hladina p53 stoupá při stresu, poškození DNA. V takovém případě je protein fosforylací stabilizován a aktivován. Po aktivaci stimuluje transkripci genů, jejichž produkty zastavují buněčný cyklus a umožňují opravu poškozené DNA, nebo aktivuje geny indukující apoptózu. Jedním z produktů p53 aktivovaných genů je p21, který inhibuje komplexy CDK 4/6-cyklin D a tím zabraňuje vstupu buňky do S fáze a replikaci poškozené DNA. Zastavení buněčného cyklu umožňuje opravu jaderné DNA. Buňky, jimž chybí funkce p53, nejsou schopny v takové situaci cyklus zastavit a hromadí se v nich další mutace, které cyklus deregulují. Navíc díky deficienci p53 unikají apoptóze a mohou se dále replikovat. (Alberts et al., 2002; Snustad & Simmons, 2009). Mutaci genu p53 můžeme najít téměř ve všech typech solidních nádorů (Pavlišta et al., 2008).

7.1.9. *brca1* a *brca2* (Brest cancer susceptibility gene 1 a 2)

Gen *brca1* je lokalizován v 17q21 a jeho produktem je polypeptid pBRCA1 o velikosti 220 kDa. pBRCA1 interaguje s více než 15 proteiny zapojenými do represe nebo aktivace transkripce, má určitou roli i v apoptóze. Produktem genu *brca2* nacházejícího se v regionu 13q12-q13 je polypeptid BRCA2 velký 384 kDa. Oba geny jsou tumorsupresory, často mutované v hereditárních tumorech prsu a ovaria. Ve sporadických nádorech dochází k mutaci výjimečně, u těchto nádorů jsou často jejich produkty méně funkční (**Kenemans et al., 2004; Snushtad & Simmons, 2009**).

Dráhy regulované *brca* zajišťují stabilitu genetického materiálu buňky. *brca1* a/nebo *brca2* jsou zapojeny do drah důležitých pro rozpoznání poškození DNA, opravy dvoušroubovicových zlomů, kontrolu buněčného cyklu, regulace transkripce a remodelingu chromatinu. Inaktivaci procesů, v nichž jsou zapojeny *brca* geny, mohou způsobit také mutace genů kódující ATM (ataxia telangiectasia mutated) and CHEK2 (checkpoint kinasa 2 buněčného cyklu) nebo mutace vedoucí k amplifikaci genu pro EMSY, což je v populaci mnohem běžnější jev než mutace *brca2* (**Friedenson, 2005**).

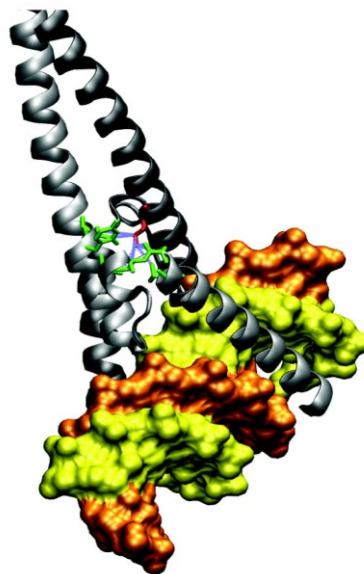
Buňky s mutací způsobující zrátu funkce BRCA1 nebo BRCA2 nedostatečně opravují dvoušroubovicové zlomy pomocí konzervativního mechanismu homologní rekombinace konverzí genů, a proto jsou tato poškození opravována nekonzervativními, potenciálně mutagenními mechanismy - spojení nehomologních konců a jednovláknové zacelení (SSA). Takové opravy způsobují genomovou nestabilitu, jsou základem predispozice k některým typům nádorových onemocnění. Ke spojení nehomologních konců dochází během G0/1. SSA je za normálních okolností neobvyklý způsob opravy DNA. Dochází k němu, nachází-li se dvoušroubovicový zlom mezi dvěma repetitivními nukleotidovými sekvencemi orientovanými stejným směrem. Při SSA je deletován úsek mezi těmito sekvencemi, je zachována pouze jedna opakující se sekvence (**Turner et al., 2005**).

Pro pacientky diagnostikované v nižším věku (pod 50 let) je typická genetická predispozice a vyšší pravděpodobnost vzniku sekundárního nádoru a to především v plicích a kostech než u pacientek diagnostikovaných ve věku pozdějším (**Evans et al., 2001**). Ženy, které zdědily jednu mutovanou *brca1* nebo *brca2* alelu, mají vyšší pravděpodobnost vzniku nádorového bujení v prsu a vaječnicích. Riziko vzniku hereditárního tumoru prsu u přenašeček mutace *brca1* přesahuje 80%. Výskyt těchto mutací v populaci (mimo populaci židovskou) není příliš běžný, nositelkami *brca* mutace je přibližně 5-10% pacientek s rakovinou prsu (**Friedenson, 2005**). Riziko vzniku tumoru vaječníků či prsu je u nositelek mutace *brca1* starších 70 let dvakrát vyšší než ve zbývající populaci. Celkové riziko vzniku

nádoru mimo prsu a vaječníků (tlusté střevo, játra, slinivka břišní) bylo významně vyšší u mužů přenašečů než u žen mutací *brca1* a s věkem ještě roste (Thompson & Easton, 2002).

7.1.10. c-Myc

Gen *c-myc* lokalizovaný v oblasti 8q24.12-q24.13 je lidským homologem *v-myc* genu retroviru MC29 ptačí myelocystomatózy (Sheiness et al., 1978). c-Myc je velice nestabilní fosfoprotein s poločasem života okolo 15-30 minut. c-Myc je degradován pomocí ubiquitinem zprostředkované dráhy vedoucí k rozložení proteinu v proteazómu. Stabilita c-Myc proteinu je regulována na různých úsecích. Na N-konci se nachází tzv. degron, který umožňuje jeho destrukci a na C-konci tzv. stabilon umožňující stabilizaci a oddělení c-Myc do subnukleárního prostoru (Supino & Scovassi, 2004). C-Myc patří spolu s N-Myc a L-Myc do myc rodiny transkripčních faktorů (Nass & Dickson, 1997), které mají velmi podobnou kódující sekvenci i genomické uspořádání. N-konec peptidového řetězce *c-myc* tvoří transaktivační doména a C-konec tvoří DNA-vazebnou/dimerizační doménu (Lüscher & Larsson, 1999). DNA-vazebná/dimerizační doména má strukturu helix-loop-helix leucinového zipu (bHLHZip), což je typické pro transkripční faktory rozpoznávající motiv CACGTG. Funkcí této domény je specifická interakce s DNA pomocí bazického regionu a homo- nebo heterodimerizace prostřednictvím bHLHZip. C-Myc nejčastěji dimerizuje s Max proteinem (dimerizuje se všemi proteiny Myc rodiny), teprve c-Myc-Max komplex se váže na specifický úsek DNA (Obr.12) (Blackwood & Eisenman, 1991).

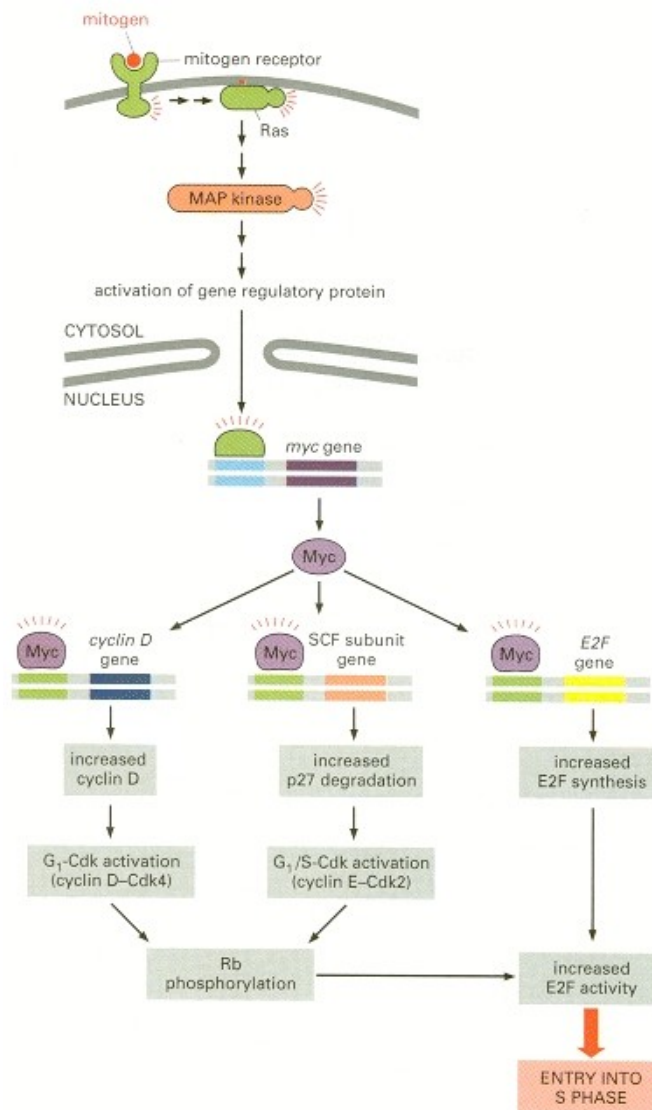


Obr.12: Struktura Myc/Max komplexu transkripčního faktoru navázaného na DNA

Oba proteiny mají helix-loop-helix motiv, přes jehož helixII převážně dimerizují. Červeně zbarvená rezidua (Ile156, Ile150) Myc interagují se zeleně znázorněnými rezidui Max (**Schuster-Böckler & Bateman, 2008**).

Max a Myc tvoří homodimery a tedy nejsou schopny samy interagovat s DNA, proto je funkce Myc závislá na dimerizaci s Max. Myc je důležitý pro regulaci proliferace, diferenciace a apoptózy. Max je schopen dimerizovat i s dalšími proteiny (Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4 a Mnt) a tvoří tedy centrální část Myc/Max/Mad transkripčních regulátorů. Mad a Mnt negativně ovlivňují buněčný růst, jsou antagonisty Myc. Mad je převážně exprimován diferenciujícími se buňkami nebo buňkami v klidové fázi (**Lüscher & Larsson, 1999**) na rozdíl od Myc, který je intenzivně exprimovaný v proliferujících buňkách (**Nass & Dickson, 1997**). Myc/Max/Mad transkripční komplex se tedy skládá z proteinů podporujících i inhibujících buněčný růst, což je rozhodující pro přepínání mezi proliferací, diferenciací, vstupem do klidové fáze a apoptózou (**Lüscher & Larsson, 1999**).

Ve fyziologických buňkách je exprese *c-myc* přísně regulována mitogenními signály. c-Myc je nezbytný pro vstup buňky do S fáze buněčného cyklu a pro odpověď na signály pro diferenciaci buňky (Obr.13.) (**Supino & Scovassi, 2004**).



Obr.13: Jedna z drah následujících po mitogenní stimulaci buňky a stimulace genů zvyšujících buněčný růst Myc proteinem.

Mitogenní signály aktivují Ras, malý protein s GTPasovou aktivitou, jehož aktivace vede ke spuštění MAP kinasové kaskády, zvýšení hladiny Myc regulačních proteinů a expresi Myc. Myc působí na buněčný cyklus zvýšením transkripce několika genů. Zvyšuje expresi cyklinu D a s tím aktivitu komplexu cyklin D-CDK4. Zvyšuje také transkripci genu kódujícího SCF podjednotku ubiquitin ligasy, což napomáhá degradaci p27, tím se zvyšuje aktivita komplexu cyklin E-CDK2. Zvýšená aktivita cyklin D-CDK4 a cyklin E-CDK2 komplexů stimuluje fosforylaci pRb, který následně uvolňuje transkripční faktory E2F. Myc také stimuluje transkripci genu pro E2F. Důsledkem exprese E2F je vstup do S fáze buněčného cyklu (Alberts et al., 2002).

In vitro může být exprese c-Myc indukována růstovými faktory a hormony stimulujícími buněčný růst, např. EGF, TGF α , IGF-I, insulin, estrogen. Linoleová kyselina a mastné kyseliny mohou podporovat buněčný růst nádoru prsu, mohou také indukovat expresi c-Myc (Nass & Dickson, 1997).

c-myc může být transformován na onkogen více mechanismy včetně translokace, amplifikace, nadměrné exprese, zvýšením stability *c-myc* proteinu, ale nejčastěji pozměněním signalizační dráhy vedoucí k inhibici či aktivaci *c-myc* genu (**Nilsson & Cleveland, 2003; Supino & Scovassi, 2004**).

U B- lymfocytových malignit a Burkittova lymfomu dochází k translokaci *c-myc* na chromozóm 2, 4 nebo 14 do blízkosti jednoho ze tří genů pro imunoglobulinový (Ig) řetězec, čímž se dostává pod kontrolu jejich promotoru a je zároveň s Ig exprimován. Nadměrná exprese Myc vede ke stimulaci proliferace. Další možnosti aktivace onkogenu *c-myc* v těchto tumorech jsou bodové mutace postihující především translokační doménu. Takové změny mohou vést k prodloužení poločasu života mutantního proteinu, protože pozměněná oblast je důležitá pro degradaci c-Myc proteazómem (**Dang et al., 1999**).

Amplifikace *c-myc* se nachází přibližně ve 20% případech karcinomu prsu, méně časté jsou změny v rámci genu. Amplifikace *c-myc* se vyskytuje také u nádorů plic, děložního krčku, vaječníků a výjimečně u tumorů tlustého střeva. Nadměrná exprese tohoto onkogenu je však u karcinomu tlustého střeva velmi častá. Amplifikace *c-myc* je spojována s vysokou proliferací, agresivitou a velikostí tumoru prsu, pokročilým stádiem nádoru, zasažením uzlin (node status), negativitou steroidních receptorů, věkem a aneuploidií. Koamplifikace *c-myc* a *her-2/neu* se vyskytuje jen výjimečně. Amplifikace genu není nutně spojená s nadměrnou expresí c-Myc, v jejímž důsledku jsou koaktivovány či exprimovány další onkogenní proteiny, např. Ras, Bcl-2 a může blokovat diferenciaci některých buněk (**Dang et al., 1999; Garcia et al., 1989; Nass & Dickson, 1997**). Amplifikace *c-myc* v nádorech bez zasažení uzlin a s pozitivními steroidními receptory je považována za negativní prognostický faktor, je spojována s časným relapsem onemocnění a krátkou celkovou dobou přežití (**Berns et al., 1992**). V rostoucích buňkách vede k snížení požadavků na růstové faktory a zkrácení G1 fáze, zatímco snížená exprese blokuje buňku v G1 fázi buněčného cyklu. c-Myc může zvýšit expresi cyklinů A a E, v některých případech může potlačit expresi cyklinu D1 a ovlivňuje také aktivitu komplexů cyclin D1-CDK4, cyclin E-CDK2 a cyclin A-CDK2 (**Mateyak et al., 1999**). Nadměrná exprese Myc také napomáhá transformaci usnadněním imortalizace buňky, díky indukci exprese katalytické podjednotky telomerasy (TERT), která zabraňuje zkracování telomer. Paradoxně nadměrná exprese myc v některých případech spouští také ARF (alternativ reading frame)-p53 dráhu vedoucí k apoptóze (**Drissi et al., 2001**).

Léčba antisense oligonukleotidy, které se vážou na mRNA a zabraňují tak nadměrné expresi c-Myc, je velmi dobře snášena pacienty s chronickou lymfocytickou leukémií, nemalobuněčným karcinomem plic, pokročilým maligním melanomem, vícenásobným myelomem a karcinomem prostaty (**Supino & Scovassi, 2004**). U nádorů tlustého střeva s amplifikací *c-myc* a *wt-p53* je indikována léčba 5-fluorouracilem,

který zvyšuje celkovou dobu přežití a prodlužuje období bez příznaků nemoci (**Arango et al., 2001**). U karcinomu tračníku s amplifikací *c-myc* byl prokázán vliv antisense fosfothiolát oligonukleotidů na snížení intenzity růstu nádorových buněk a hladiny *c-myc* mRNA i proteinu. V důsledku toho antisense fosfothiolát oligonukleotidy redukují množství mRNA Bcl2, Bclxl, CDK2, cyklinu E1, CDK1 a cyklinu B1, spolu se zvýšením hladiny mRNA p21, p27, bax a kaspasy 3. Jejich účinnost ještě zvyšují cytostatika. Kombinovaná léčba má intenzivnější apoptotický efekt než samotná cytostatika či antisense fosfothiolát nukleotidy (**Abaza et al., 2008**). Na tumor prsu působí antisense oligonukleotidy c-Myc mRNA stejně, značně snižují expresi c-Myc, a tím i cyklinu D1 a inhibují proliferaci nádorových buněk. Antiestrogeny také vyvolávají akutní snížení hladiny c-Myc (**Carroll et al., 2002**).

7.1.11. Cyklin D1 (*ccnd1, prad1, bcl1*)

Gen *ccnd1* kódující cyklin D1 se nachází v oblasti q13 chromozómu 11 (**Motokura et al., 1991**), je to jeden z nejčastěji alterovaných regulátorů buněčného cyklu v tumorových buňkách (**Kim & Diehl, 2009**).

Cyklin D1 má řadu biologických funkcí, ovlivňuje migraci buněk, apoptózu, mitochondriální funkce a metabolismus, regeneraci neuronů, blokuje diferenciaci a stimuluje proliferaci buněk. Cykliny jsou alosterické regulátory cyklindependentních kinas, které po asociaci s příslušnými cykliny fosforylují specifické substráty a tím zajišťují přechod do další fáze buněčného cyklu. D cykliny (D1, D2, D3) asociují s CDK4/6 a zprostředkovávají přechod z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu (Obr.5) (**Kim & Diehl, 2009**). Jejich exprese je stimulována růstovými faktory nebo dalšími mitogeny (např. steroidní hormony). Mimo cyklinů ovlivňuje aktivitu CDK také jejich posttranslační modifikace (fosforylace) a vazba inhibitorů CDK (CKI). CKI můžeme rozdělit na příslušníky CIP-KIP rodiny, např. p21, p27 a p57, které svou vazbou mohou inhibovat téměř všechny cyklin-CDK komplexy a na členy INK rodiny, např. p15, p16, p18 a p19, ty inhibují pouze komplexy CDK4/6. CKI jsou důležité pro zastavení růstu v případě poškození DNA či stárnutí. Aktivní CDKs fosforylují proteiny Rb, což uprostřed G1 fáze vede k uvolnění aktivních forem E2F transkripčních faktorů, které indukují expresi cyklinu A, E a mnoha dalších genů specifických pro S fázi např. thymidin kinasa, polymerasa a. Cyklin E následně tvoří komplex s CDK2, což je nezbytné pro přechod do S fáze (**Mateyak et al, 1999**). Degradaci cyklinu D1 pozitivně reguluje fosforylace tyrosinového rezidua (Tyr-286) blízko C-konce glykogensyntasakinasy-3beta (GSK-3B). GSK-3B může být inhibována mitogenními dráhami zahrnujícími Ras, PI3K a proteinkinasy B (AKT) (**Diehl et al., 1998**).

K nadměrné aktivaci CCND1 může dojít bodovou mutací, chromozomální přestavbou nebo amplifikací (Kim & Diehl, 2009). Bodovou mutací měnící threonin 286 za alanin vzniká vysoce stabilní mutant cyklinu D1, odolný vůči fosforylaci GSK-3B (Diehl et al., 1998). Běžným genetickým mechanismem patogeneze B-buněčných lymfomů je translokace t(11;14)(q13;q32) *ccnd1* za oblast promotoru pro těžký imunoglobulinový řetězec, s nímž je poté exprimován (Kim & Diehl, 2009).

Amplifikace *ccnd1* se vyskytuje přibližně u 15% primárních tumorů prsu a u mnoha dalších nádorových onemocnění včetně nádorů plic, tlustého střeva, krku a hlavy. Nadměrná exprese bývá nalezena u 30-50% případů rakoviny prsu. Běžnější příčinou deregulace exprese CCND1 bývá indukce onkogenními signály než mutace či translokace *ccnd1* (Hosokawa & Arnold, 1998). Nadměrná exprese cyklinu D1 má klíčovou roli v kontrole vývoje prsní žlázy, progresu buněčného cyklu epitelových buněk prsních žláz a tumorigenezi (Wang et al., 1994). Deregulace exprese CCND1 může vést k vyvolání abnormálního autonomního růstu bez nutnosti stimulační faktory. Amplifikace *ccnd1* byla nalezena převážně v tumorech prsu pozitivních na ER i PR (Seshadri et al., 1996). U tumoru žaludku s amplifikací *ccnd1* bylo testováno, zda terapie antisense oligodeoxynukleotidy cyklinu D1 (ASODN) ovlivňuje buněčný cyklus a expresi jeho regulátorů. ASODN inhibují růst nádorových buněk, snižují expresi cyklinu D1 a pRB a stimulují expresi p21. Také pozitivně ovlivňují chemosenzitivitu nádorových buněk vůči 5-fluorouracilu, metotrexátu a cisplatině (Shuai et al., 2003; Shuai et al., 2006). Podobné studie u karcinomu prsu zatím nebyly publikovány. Hladinu mRNA cyklinu D1 prokazatelně snižuje také Herceptin (Yakes et al., 2002).

8. LÉČBA RAKOVINY PRSU

Protinádorová léčba využívá různých léčebných postupů vedoucích k maximální redukci nádoru, odstranění všech nádorových buněk nebo jejich usmrcení. Zároveň by měla co nejméně poškozovat pacienta, ať už po stránce fyzické či psychické. Kromě protinádorové léčby využívá onkologie léčbu podpůrnou, která se snaží o potlačení symptomů vyvolaných nádorem, např. léčba bolesti. (Koutecký et al., 2004; Adam et al., 2003).

Protinádorovou léčbu dělíme z hlediska léčebného cíle na neoadjuvantní, adjuvantní a paliativní. Neoadjuvantní terapii karcinomu prsu podstupují pacienti před operativním odstraněním nádoru. Jejím účelem je zmenšení nádoru spolu se zničením mikrometastáz a tím zvýšení pravděpodobnosti úspěchu radikálních zákroků. Adjuvantní terapie (kurativní) má za cíl úplné odstranění karcinomu pomocí chirurgických postupů, chemoterapie, cílené biologické či hormonální terapie či radioterapie. Operační odstranění nádoru prsu můžeme rozlišit na mastektomii s odstraněním podpažních lymfatických žláz, prostou mastektomii,

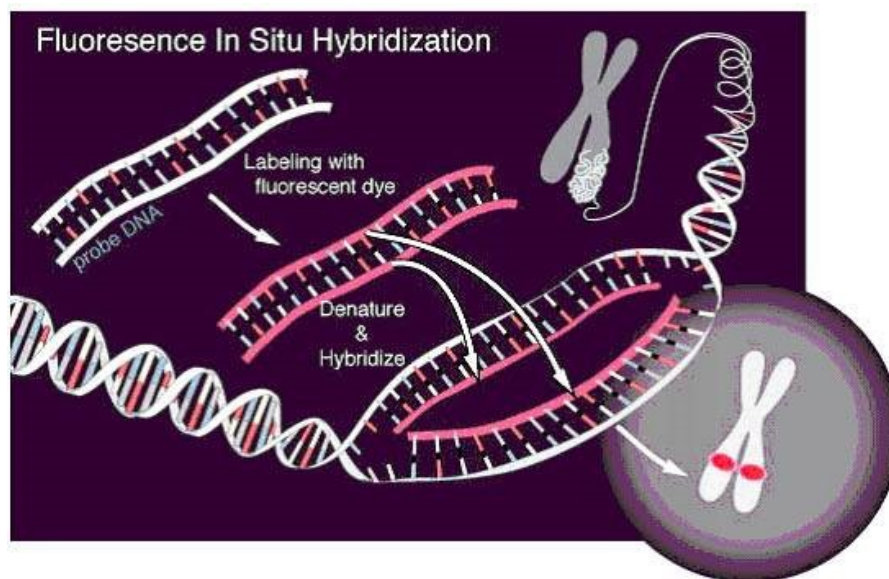
částečnou (vynětí postiženého kvadrantu prsu) a na tumorektomii (odstranění nádoru s 1 cm lemem nepoškozené tkáně). Paliativní léčbou (nekurativní) jsou léčeni pacienti s nádory v pokročilém stádiu nemoci (metastatické onemocnění, stádium IV.) či s relapsem onemocnění. Cílem je udržet co nejvyšší kvalitu života nemocného. Adjuvantní terapií (nejčastěji chemoterapie či radiooterapie) lze léčit rovněž nádory s mikrometastázami za předpokladu chemosenzitivity nádoru (**Adam et al., 2003; De Vita et al., 2008; Klener, 2002**).

VI. EXPERIMENÁLNÍ ČÁST

1. ZJIŠTĚNÍ STATUTU GENŮ C-MYC, CCND1 A CHROMOZÓMŮ 8 A 11 U PACIENTŮ S KARCINOMEM PRSU A POLYZOMIÍ CHROMOZÓMU 17

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) patří mezi nejužívanější cytogenetické metody. Její značnou výhodou je vysoká senzitivita a specifita vázaná na velikost použité sondy. Pomocí FISH lze detekovat a lokalizovat přítomnost či ztrátu specifického úseku DNA. Používá se také k detekci a lokalizaci specifické mRNA, tedy k určení míry exprese daného genu. Touto metodou lze analyzovat široké spektrum vzorků, archivované i čerstvé vzorky tkání či buněk. Používá se především ke zjišťování chromozomálních i genových abnormalit v nádorových tkáních a při tzv. preimplantačních vyšetřeních embrya, při nichž je možné pomocí FISH zjistit aneuploidie, strukturní aberace, mutace genů či pohlaví embryí.

Jedná se o metodu založenou na principu komplementárního párování vyšetřovaného úseku DNA s fluorescenčně značenou sondou (viz. obr.14). Sonda může být specifická pro určitý gen, celý chromozóm či jeho část, centromerické nebo telomerické oblasti, podle toho dělíme sondy využívané k FISH na lokusově specifické (LSI), alfa satelitní (centromerické, CEP) a malovací sondy (celochromozómové, WCP). K vizualizaci navázané sondy je třeba fluorescenční mikroskop s příslušnými filtry, neboť se často využívá značení vzorků LSI a CEP zároveň (značené barvami s různými spektry, nejčastěji SpectrumOrange-oranžová a SpectrumGreen-zelená).



Obr. 14: Schématické znázornění fluorescenční *in situ* hybridizace

Nejprve dochází k denaturaci DNA sondy i dvoušroubovice DNA a následně k hybridizaci sondy s komplementárním úsekem DNA (appendix.bf.jcu.cz/Dolezal/vyuka/dna/molbio.htm).

Během své práce jsem používala centromerické sondy specifické pro oblast centromery chromozómů 8 a 11 a lokusově specifické sondy pro zjištění počtu kopií genu *c-myc* a *ccnd1* v jednotlivých jádrech nádorových buněk tkáně prsu. Cílem této práce bylo určení statutu *c-myc* a *ccnd1* u pacientů s polyzomií CH17. Polyzomie chromozómu 17 byla určena pomocí CEP17.

1.1. Materiál a pomůcky

Bakteriální klon pZ8.4 (CEP8) s rezistencí na ampicilin, bakteriální klon pRB11 (CEP11) s rezistencí na ampicilin, bakteriální klon RP11-300/6 (LSI *ccnd1*) s rezistencí na chloramfenikol, bakteriální klon RP11-440N18 (LSI *c-myc*) s rezistencí na chloramfenikol (Prof. Mariano Rocchi, Universita di Bari, Italy), QIAfilter Mega Kit (QIAGEN), BioPrime Array CGH genomic Labeling System (invitrogen), Cot-1 DNA (Abbott Molecular), LB médium (Sigma Aldrich), ampicilin (Sigma Aldrich), izopropanol, 96% ethanol, 10% glycerol, 3 M octan sodný, TE pufr, Hybridizační pufr (Abbott Molecular), DAPI II (4,6-diamidino-2-fenylindol; Abbott Molecular), SpectrumGreen dUTP a SpectrumOrange dUTP (Abbott Molecular Inc.), pepsin (Sigma Aldrich), 1 M NaSCN (Sigma Aldrich), formamid (Sigma Aldrich), imerzní olej (Olympus), 0,2 M HCl, xylén, 10% formalin, fyziologický roztok, 20x SSC, WB pufr, 10x PBS, WS1, WS2, deionizovaná voda, podložní a krycí skla, lepidlo (rubber cement), fluorescenční mikroskop BX-60 s imerzním objektivem (Olympus), hybridizér HYBrite Denaturation/Hybridization System for FISH (Vysis), vodní lázeň, pH metr, termostat, mikrocentrifuga, vyhřevná plotýnka (termoblok), temperovaná třepačka, skleněné uzavíratelné lahve 50 ml, 100 ml, 250 ml a 500 ml, odměrné válce, zkumavky, kádinky, mikrozkumavky, pipety, bakteriologická klička, minicentrifuga, termostat, temperovaná třepačka, vortex, Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies), centrifuga.

1.2. Vzorky patientských tkání

Referenční laboratoří pro stanovení genu Her-2/neu bylo poskytnuto 151 patientských vzorků tkání karcinomu prsu s polyzomií CH17. Polyzomie byla prokázána α -satelitní sondou na centromerickou oblast chromozómu 17 (CEP17). Pro experimenty byly použity histologicky ověřené 4-6 μ m silné řezy parafinových bloků tkání fixovaných formalínem.

1.3. Složení roztoků

P1 pufr	50 mM Tris-Cl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNasa
P2 pufr	200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)
P3 pufr	3,0 M octan draselný (pH 5,5)
FWB2 pufr	1 M octan draselný (pH 5,0)
QBT pufr	750 mM NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% izopropanol (v/v); 0,15% Triton X-100 (v/v)
QC pufr	1,0 M NaCl; 50 mM MOPS (pH 7,0); 15% izopropanol (v/v)
QF pufr	1,25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl (pH 8,5); 15% izopropanol (v/v)
TE pufr	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA
Exo-Klenow	40 U/µl; Klenow fragment v 100 mM fosfátu draselném (pH 7,0); 1
Fragment	mM DTT; 50% glycerol
2.5X Random Primers Solution	125 mM Tris-HCl (pH 6,8); 12,5 mM MgCl ₂ ; 25 mM 2-merkapt ethanolu; 750 µl/ml oligodeoxyribonukleotidové primery (random octamers)
10X DTP Nukleotide Mix	1,2 mM dATP; 1,2 mM dGTP; 1,2 mM dCTP; 0,6 mM dTTP v 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 M EDTA
Purifikační pufr A	součástí kitu
Purifikační pufr B	součástí kitu
Hybridizační pufr	50%formamid; 2x SSC; 10% dextran sulfát; 0,1% Tween20; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
WB pufr	2x SSC (pH 7,0)
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M citrát sodný-dihydrát (pH 5,3)
proteasový pufr	fyzilogický roztok (pH 2,0)
10% formalin	4% formaldehyd v 10x PBS
10x PBS	1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na ₂ HPO ₄ ; 8 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,3)
WS1	0,4x SSC; 0,3% NP-40 (pH 7,5)
WS2	2x SSC; 0,1% NP-40; pH 7,0

1.4. Použité metody a pracovní postupy

1.4.1. Kultivace bakteriálních klonů

Pro přípravu specifických DNA sond byly použity subklony *Escherichia coli* uvedené v tabulce 1. Tyto bakterie byly skladovány v 10% roztoku glycerolu při -80°C. Po pozvolném rozmrznutí byla každá kultura smíchána s 15 ml LB média a inkubována do druhého dne ve třepačce při 37°C. Dalšího dne byly jednotlivé kultury bakterií inokulovány

sterilní bakteriologickou kličkou na selekční agarové plotny a inkubovány přes noc v termostatu při teplotě 37°C. Z každé agarové plotny bylo odebráno 5 kolonií a v LB médiu s 50 µg/ml ampicilinu či 12,5 µg/ml chloramfenikolu (viz tab.1.) při 37°C z nich byl přes noc vykultivován subklon. Část takto připravených subklonů byla použita k přípravě sond, zbytek byl pro další použití zamražen v 10% glycerolu při -80°C.

Tab.1: Bakteriální klony použité k přípravě fluorescenčně značených sond

Sonda	Použitý klon	Typ značení	Rezistence	Koncentrace
<i>c-myc</i>	RP11-440N18	SpectrumOrange	chloramfenikol	12,5 µg/ml
<i>ccnd1</i>	RP11-300I6	SpectrumOrange	chloramfenikol	12,5 µg/ml
CEP8	pZ8.4	SpectrumGreen	ampicilin	50 µg/ml
CEP11	pRB11	SpectrumGreen	ampicilin	50 µg/ml

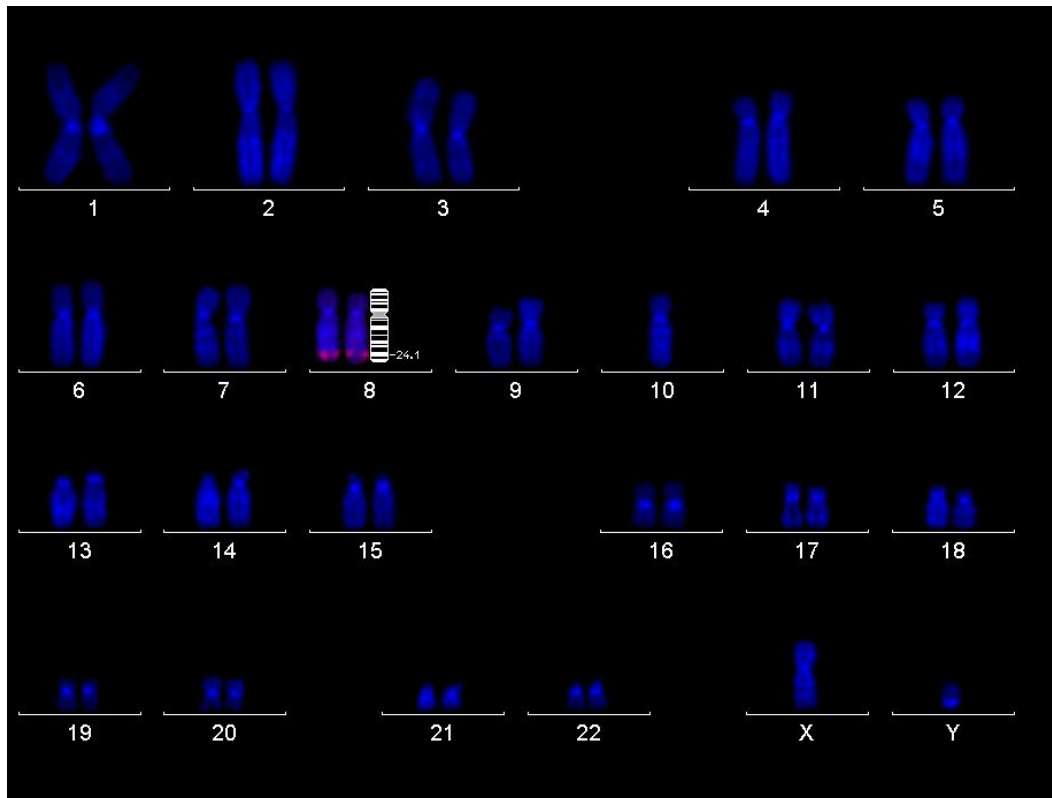
1.4.2. Izolace plazmidu

Pro izolaci plazmidu byl použit *QIAfilter Mega Kit* od firmy QIAGEN, (viz kapitola 1.3). Subklon získaný kultivací přes noc při 37°C v LB médiu s ampicilinem (popř. chloramfenikolem) byl centrifugován 20 minut při 3000 g. Vzniklá bakteriální paleta byla zcela resuspendována v 50 ml *P1 pufru*. Ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 50 ml *P2 pufru*. Uzavřená lahev se suspenzí byla pomalu 4-6 x invertována a stále uzavřená inkubována při laboratorní teplotě 5 minut. Poté bylo přidáno 50 ml *P3 pufru*, směs byla opatrným převrácením promíchávána až do vytvoření bílé sraženiny. Obah lahve byl nalit na *QIAfilter Mega Cartridge*, kde byla směs inkubována 10 minut při laboratorní teplotě a následně přefiltrována za sníženého tlaku. Sraženina zachycená filtrem byla promyta 50 ml *FWB2 pufru*. Filtrát byl dále nanesen na předem ekvilibrovaný (35 ml *QBT pufr*) *QIAGEN-tip 2500r*, přefiltrován a promyt 200 ml *QC pufru* (filtrát byl odstraněn). Na koloně zůstal navázaný bakteriální plazmid, který byl eluován 35 ml *QF pufru*. Eluát byl smíchán s 24,5 ml izopropanolu, rozdělen do čtyř zkumavek a centrifugován 45 minut při 13500 g při 4°C. Supernatant byl odstraněn, k sedimentu bylo do každé zkumavky přidáno 10 ml vychlazeného 70% ethanolu a zkumavky byly centrifugovány 10 min při 10000 g za teploty 1°C. Supernatant byl odstraněn a vzniklý sediment, plazmidová DNA, vysušen při laboratorní teplotě a rozpuštěn ve 100 µl TE pufru. Koncentrace a čistota DNA byla stanovena spektrofotometricky přístrojem Nanodrop ND-1000. V průběhu práce byly dodrženy všechny bezpečnostní protokoly, dle Oznámení o práci s geneticky modifikovanými organismy (GMO), č. 3172/ENV/06. Práci s GMO jsem prováděla pod dohledem proškoleného pracovníka.

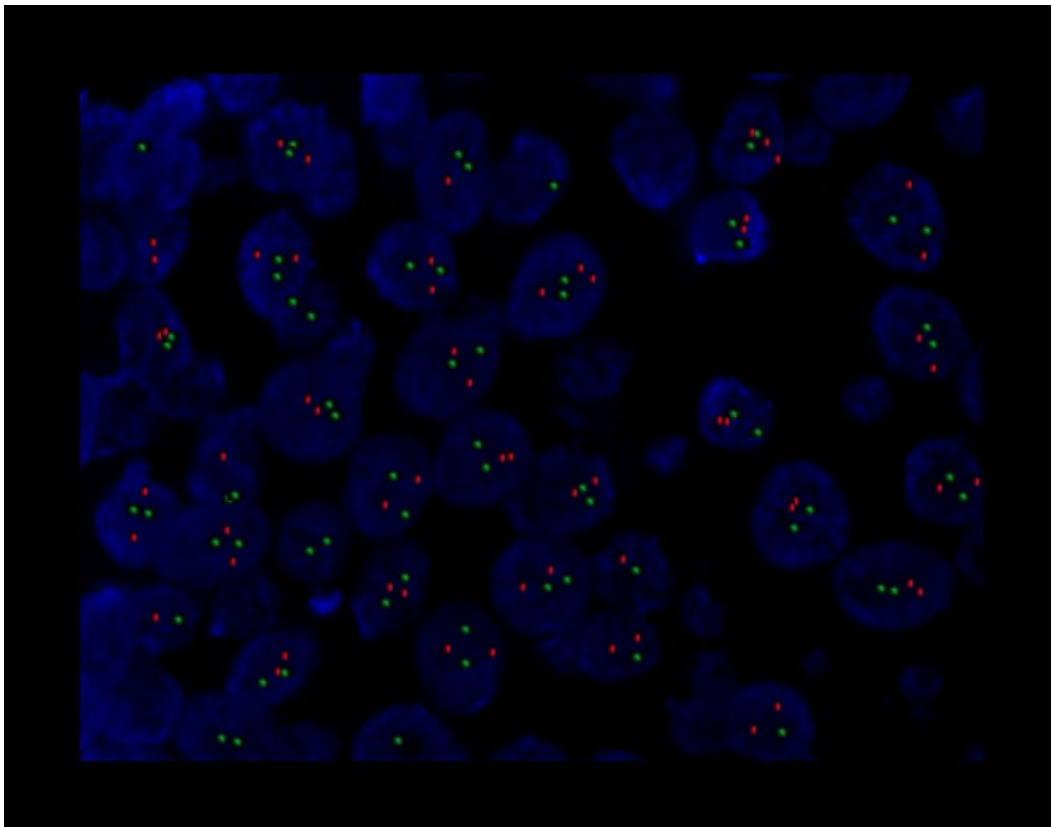
1.4.3. Fluorescenční značení izolovaného plazmidu

Pro fluorescenční značení bakteriální DNA byl použit BioPrime Array CGH genomic Labeling System kit (Invitrogen), níže uvedené roztoky jsou součástí tohoto kitu. K 500 ng genomické DNA bylo přidáno 21 μ l destilované vody a 20 μ l 2,5X Random Primers Solution. Vzniklá směs byla promíchána za použití vortexu, stočena a 10 minut denaturována ve vodní lázni o teplotě 96 °C. Denaturovaná směs byla 2 minuty chlazená v ledové lázni a stočena. Následně bylo ke směsi přidáno 5 μ l dUTP mixu (směs dNTP) a 1,5 μ l SpectrumOrange-dUTP nebo SpectrumGreen-dUTP, směs byla zvortexována a stočena za nepřístupu světla (vzhledem k citlivosti fluorescenčně značených nukleotidů na světlo, je nutné minimalizovat jejich expozici slunečnímu záření). Po přidání 1 μ l Exo-Klenow Fragment mixu byl obsah zkumavky jemně promíchán proklepáním, stočen a inkubován přes noc při 37 °C. Následujícího dne byla směs po smíchání s 50 μ l TE pufru a 400 μ l purifikačního pufru A přenesena do purifikační kolony vložené do Eppendorfovy zkumavky a 1 minutu centrifugována při 11000 g. Po odstranění eluátu bylo do kolony napipetováno 600 μ l purifikačního pufru B, následovala 1 minuta centrifugace při 11000 g, odstranění eluátu a vysušení kolony centrifugací po dobu 1 minuty při 11000 g. (V případě, že na kolonce po první centrifugaci nezůstane barevně značená DNA, přepipetujeme eluát zpět do kolony a centrifugaci opakujeme.) Po vysušení centrifugací byla kolonka přenesena do nové Eppendorfovy zkumavky. Značená DNA byla eluována 50 μ l destilované vody a 1 minutu centrifugována při 11000 g.

50 μ l značené DNA bylo smícháno s 25 μ l Cot-1 DNA, 7,5 μ l 3 M acetátu sodného a 206 μ l 96% ledového ethanolu. Obsah zkumavky byl převrácením promíchán a 20 minut inkubován při -70 °C. Směs byla 15 minut centrifugována při 4 °C a 11000 g, supernatant odstraněn a sediment byl 5 minut sušen na vzduchu. Sediment byl rozpuštěn v 50 μ l hybridizačního pufru, 10 minut inkubován ve vodní lázni o teplotě 37 °C a zvortexován. Takto připravená DNA sonda je uchovávána v temnu při teplotě -20 °C. Kvalita hybridizace sondy byla ověřena na deparafinizované tkáni. Specifita sondy byla ověřena na mitotickém preparátu (Obr.15).



(A)



(B)

Obr.15: Ověření specifity sondy pro gen *c-myc* na mitotickém preparátu (A) a parafinovém řezu tkáně (B).

1.4.4. Deparafinizace řezů tkáně

Řezy imobilizované na pozitivně nabitá skla byly nejprve deparafinizovány třemi po sobě jdoucími desetiminutovými lázněmi v xylenu, dvakrát po 5 minutách promyty v 96 % ethanolu a 3-5 minut vysušeny na vyhřevné plotýnce o teplotě 45-50°C. Následně byly vzorky tkáně inkubovány 20 minut v 0,2 M HCl, 1 minutu promývány v deionizované vodě a 3 minuty v oplachovacím WB pufru. Následovala blokáce nespecifické fluorescence v 1 M NaSCN (80°C, 20 min), 1 minuta promytí v deionizované vodě a dvě 5 minutové promytí v oplachovacím pufru WB. Tkáň byla během 40 minut natrávena roztokem pepsinu v proteázovém pufru (0,5 mg/ml; katalitická aktivita 2500-3000 U/mg) o teplotě 37°C. Preparáty byly dvakrát po 5 minutách promyty v oplachovacím pufru WB, během 3-5 minut vysušeny na termobloku o teplotě 45-50°C a 10 minut fixovány v 10% roztoku formalínu. Následovaly dvě promytí (2x5 minut) v oplachovacím pufru WB a vysušení (45-50°C, 3-5 min).

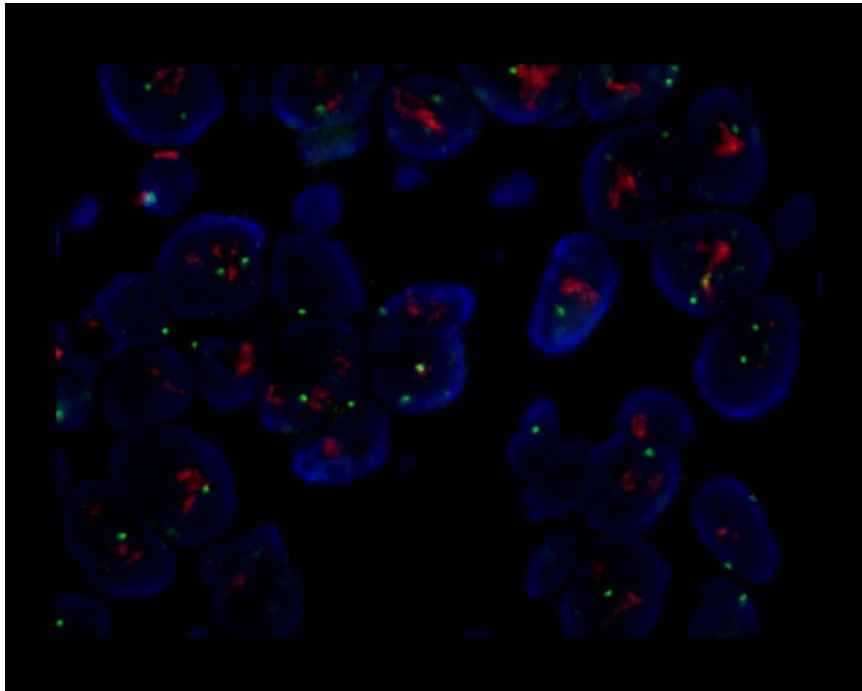
1.4.5. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Na deparafinizované preparáty bylo nanášeno 5 µl připravené fluorescenční sondy v hybridizačním pufru. Preparáty byly překryty krycími skly a okraje zalepeny. Takto připravené vzorky byly 1 minutu při 85°C kodenaturovány v přístroji HyBrite a přes noc hybridizovány při 37°C. Následující den byla po odstranění krycích skel odmyta přebytečná sonda promývacím roztokem WS1 (58°C, 4 min) a WS2 (lab. teplota, 30 s). Promyté vzorky byly vysušeny v temnu při laboratorní teplotě. Na preparáty bylo následně nanášeno 4,5 µl DAPI II (montážní a barvicí roztok) a vzorky byly překryty krycími skly. Takto připravené preparáty byly hodnoceny za pomoci fluorescenčního mikroskopu s příslušným filtrem a imerzním objektivem. U každého vzorku bylo odečteno nejméně 100 jader, ze kterých byl vypočítán průměrný počet kopií signálu na jádro.

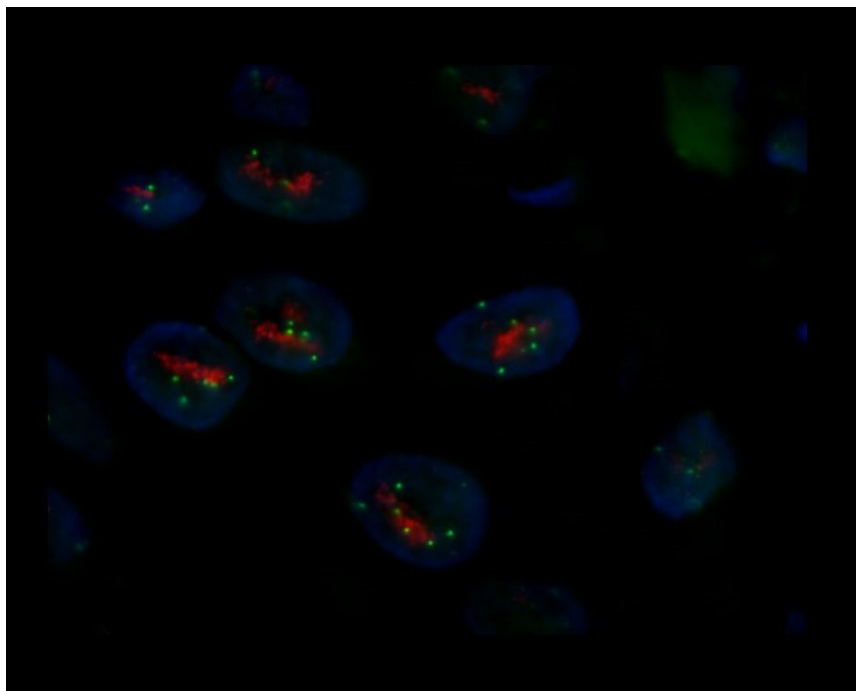
1.5. VÝSLEDKY

Z 3674 vzorků rakovinné tkáně prsu Referenční laboratoře bylo vyšetřeno CEP17 sondou 3380 pacientů, z nichž u 618 vzorků byla prokázána polyzomie (CH17 \geq 2,5), tj. u 18% pacientů. Ze souboru pacientů s určeným statutem CH17 bylo pro stanovení počtu kopií genů *c-myc* a *ccnd1*, CH8 a CH11 vybráno 756 vzorků tkání karcinomu prsu, z nichž 503 mělo fyziologický počet CH17 (srovnávací skupina) a 253 s prokázanou polyzomií chromozómu 17. V rámci této bakalářské práce bylo fluorescenční *in situ* hybridizací za použití připravených hybridizačních DNA sond vyšetřeno 49 vzorků s polyzomií CH17 (příloha 1) a 102 vzorků z kontrolní skupiny (příloha 2). Analýza vzorků byla zaměřena na zjištění polyzomie chromozómů 8 a 11 a amplifikace genů *c-myc* a *ccnd1*. Za polyzomické jsme považovali vzorky s průměrným počtem kopií chromozómů \geq 2,5. Za amplifikaci genů

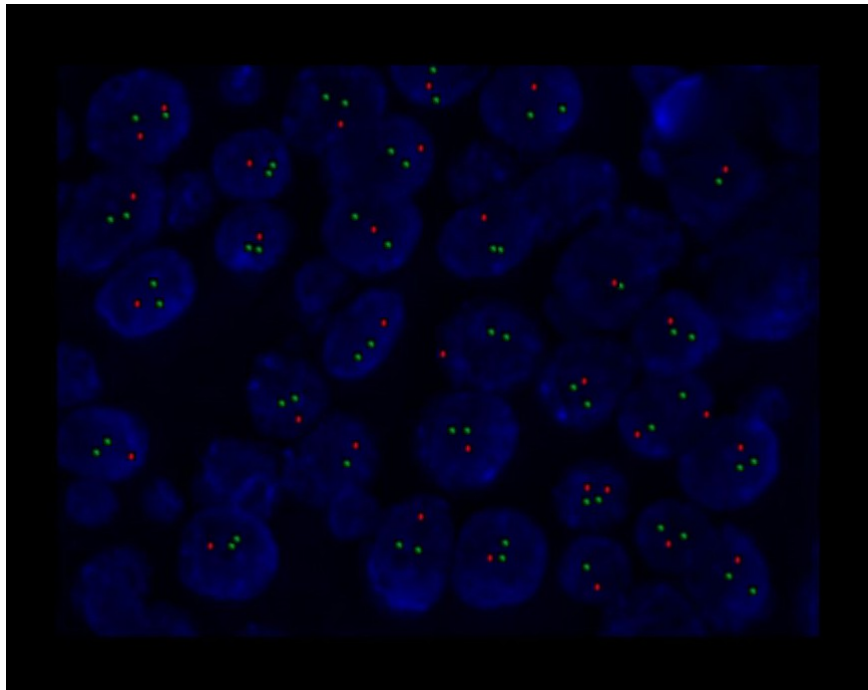
ccnd1 a *c-myc* jsme považovali počet kopií daného genu $\geq 2,5$ (počítáno ve 100 jádrech). Průměrný věk patientek s polyzomií CH17, jejichž vzorky tkání byly zpracovány během bakalářské práce byl 58 let, nejmladší pacientce bylo v době odběru tkáně 38 let a nejstarší 77 let (viz příloha č.1). Průměrný věk patientek v kontrolní skupině byl 54 let, věk patientek se pohyboval od 30 do 75 let (viz příloha .2).



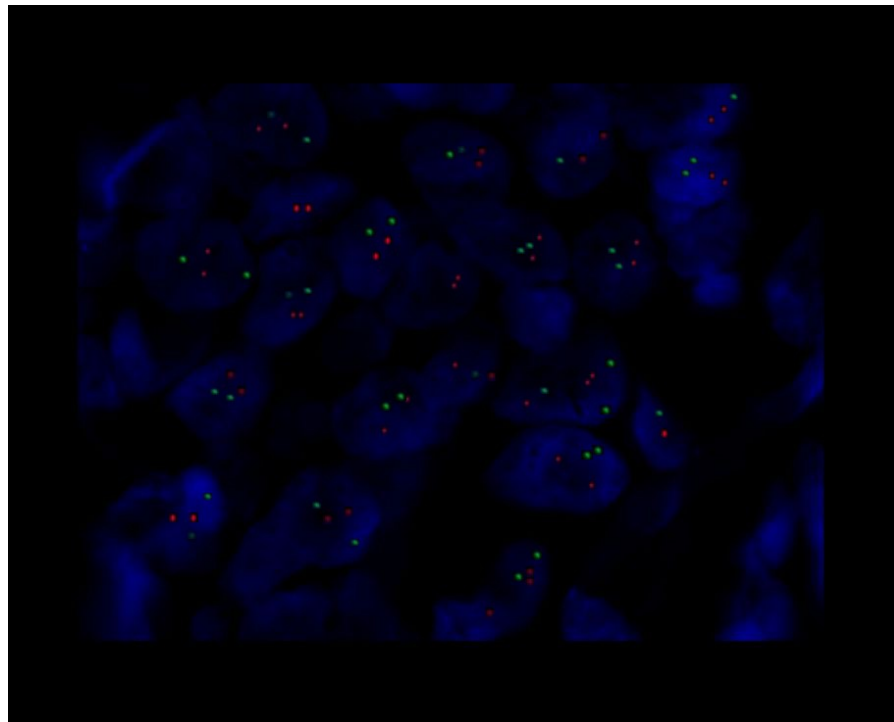
Obr.16: Amplifikace genu *ccnd1* (oranžový signál- *ccnd1*, zelený signál-CH11)



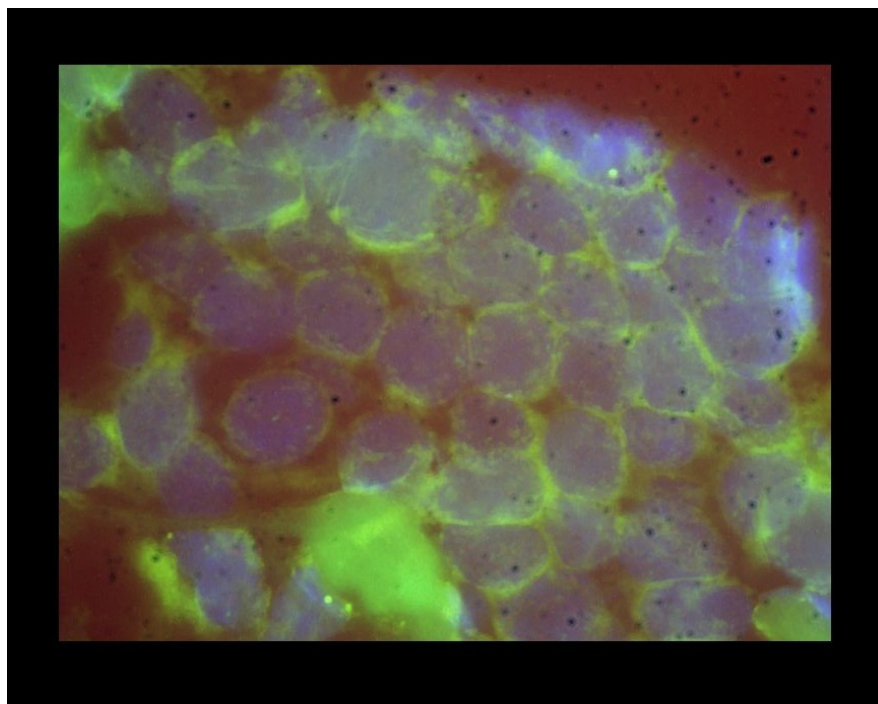
Obr.17: Amplifikace genu *ccnd1* s polyzomií CH11 (oranžový signál- *ccnd1*, zelený signál-CH11)



Obr.18: Delece genu *c-myc* (oranžový signál- *c-myc*, zelený signál-CH8)



Obr.19: Vzorek s fyziologickým počtem kopií genu *ccnd1* i CH11 (oranžový signál - *ccnd1*, zelený signál - CH11)



Obr.19: Nehodnotitelný vzorek

Tab.2: Výsledků analýzy vzorků s fyziologickým počtem CH17 a polyzomií CH17 (soubor vzorků odečtených v rámci bakalářské práce)

	pol. CH11	amp. <i>ccnd1</i>	pol. CH8	amp. <i>c-myc</i>
fyz. CH17	14,7%	55,9%	27,0%	57,0%
pol. CH17	23,4%	55,3%	22,4%	51,0%

V tabulce 2 jsou uvedené výsledky analýzy prováděné v rámci této bakalářské práce. V této skupině vzorků je výskyt polyzomie CH11 o 8,7% (1,59x) vyšší u pacientů s polyzomií CH17 než u srovnávací skupiny. U pacientů s polyzomií chromozómu 17 byl sledován o 4,6% nižší výskyt polyzomie CH8. Pouze u 3 vzorků tkání se vyskytovala polyzomie všech 3 chromozómů najednou, jedná se tedy pravděpodobně o polyploidii. V rámci analyzované skupiny se polyzomie CH11 vyskytovala u 17,4% (26/149) vzorků a polyzomie CH8 u 25,5% (38/149). Amplifikace *ccnd1* byla u vzorků s polyzomií CH17 o 0,6% nižší a amplifikace *c-myc* o 6% nižší než u vzorků s diploidním počtem CH17 v jádrech buněk. Celkově se amplifikace *ccnd1* vyskytovala u 55, 7% (83/149) vzorků a amplifikace *c-myc* u 55,0% (82/149).

Z těchto dat nelze vyvozovat závěry, zda polyzomie CH17 souvisí s výskytem polyzomie CH11 a CH8 a amplifikací genů *c-myc* a *ccnd1*. Soubor analyzovaných vzorků však nebyl dostatečně obsáhlý (viz porovnání tab.2 a tab.3).

V rámci komplexní studie, při níž bylo vyšetřeno 756 nádorových tkání karcinomu prsu, se podařilo prokázat statisticky významné korelace mezi častějším výskytem amplifikace *c-myc* a *ccnd1* u pacientů s polyzomií chromozómu 17 (viz tab.3), což je z části

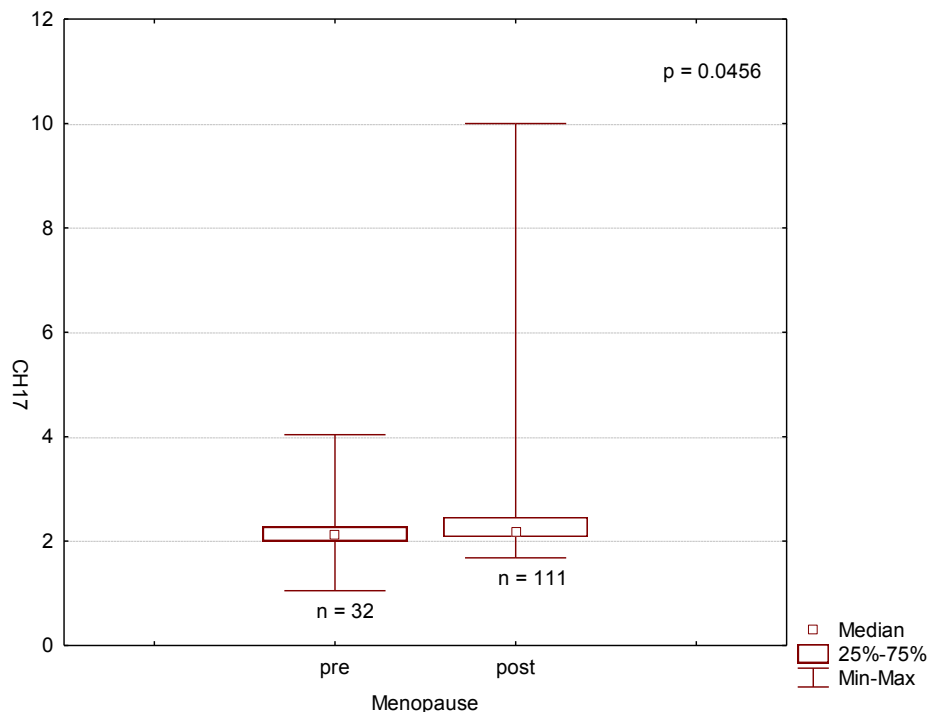
důsledkem polyzomie chromozómů, na nichž se geny nachází. Výskyt amplifikace *ccnd1* byl u polyzomických vzorků o 21,4% vyšší a amplifikace *c-myc* o 30,1% vyšší. Celkově byl vyšší počet kopií ($\geq 2,5$) *c-myc* nalezen u 26% a vyšší počet kopií ($\geq 2,5$) *ccnd1* u 37% vzorků tkáně.

Z celkového počtu vyšetřených pacientek s karcinomem prsu byl vybrán soubor 140 pacientek, které spadají do Olomouckého Komplexního onkologického centra (KOC). U těchto pacientek byla z Herceptinového registru získána zaslepená a anonymizovaná klinická data, ta byla korelována s našimi cytogenetickými výsledky. Byla prokázána statisticky významná korelace mezi vyšším věkem (postmenopauzální) pacientů a statutem CH17 (Graf.1).

Tab.3: Výsledků analýzy vzorků s fyziologickým počtem CH17 a polyzomií CH17 (soubor všech odečtených vzorků)

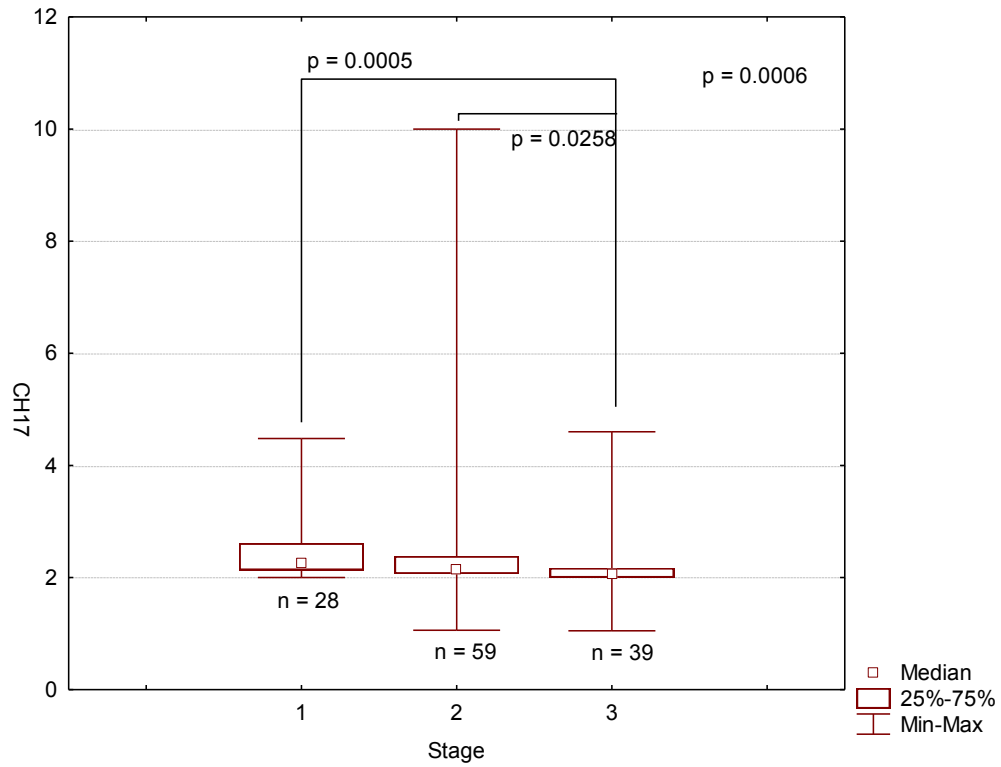
	pol. CH11	amp. <i>ccnd1</i>	pol. CH8	amp. <i>c-myc</i>
fyz. CH17	6,6%	29,8%	2,1%	10,2%
pol. CH17	22,0%	51,2%	28,2%	40,3%

Graf.1: Status CH17 u premenopauzálních a postmenopauzálních pacientů. U postmenopauzálních pacientek je počet kopií chromozómu 17 významně vyšší než u premenopauzálních.



V porovnání statusu chromozómu 17 a jednotlivých klinických stádií karcinomu prsu byla zjištěna vysoce signifikantní korelace. Polyzomie CH17 se preferenčně vyskytuje u pacientů v nižších klinických stádiích (viz graf.2).

Graf.2: Status CH17 v závislosti na stádiu onemocnění



1.6. DISKUSE A ZÁVĚR

Polyzomie CH17 byla prokázána u 18% (618/3380) pacientů s karcinomem prsu vyšetřených v Referenční laboratoři. Tato data se shodují s výsledky ostatních studií, které uvádí výskyt polyzomie chromozómu 17 u karcinomu prsu u 13 až 46% případů. Tento poměrně široký rozptyl výsledků studií je dán především rozdíly studovaných populací a definicí polyzomie. Některé studie navíc rozlišují nízkou polyzomii (CH17= 2,26-3,75) a vysokou polyzomii (CH17>3,75) (**Beser et al., 2007; Salido et al., 2005; Tsukamoto et al., 2001; Vanden Bempt et al., 2008**). Polyzomie CH17 se vyskytuje převážně u pacientek vyššího věku (>50), což se shoduje se studovanou skupinou pacientek, z níž 40 pacientek ze 48 (83%) bylo při odběru nádorové tkáně prsu starších 50 let (viz příloha 1). V kontrolní skupině bylo 70,3% (71/101) pacientek starších 50 let (**Vanden Bempt et al., 2008**). Vyšší počet kopií CH17 se podle našich výsledků preferenčně vyskytuje u pacientek s nižším stádiem onemocnění (graf. 2). Podobné výsledky v literatuře publikovány nebyly. Polyzomie CH17 je podle literatury asociována s negativními prognostickými indikátory, např. vysokým jaderným i histologickým gradingem, vysokou mitotickou aktivitou a negativitou ER (**Watters et al., 2003; Krishnamurti et al., 2009**). Výsledky těchto studií naše data nepotvrdili. *c-myc* je protonkogen amplifikovaný ve 20-30% případů karcinomu prsu (**Escot et al., 1986; Garcia et al., 1989; Tavassoli et al., 1989; Varley et al., 1987**). V naší skupině pacientů byla nalezena amplifikace *c-myc* u 55% vzorků, z nichž u 30% bylo s polyzomií CH17 (tab.2.). V celé studii bylo 26% vzorků s amplifikací *c-myc*, což odpovídá údajům z literatury. V rámci amplifikace můžeme rozlišovat tzv. amplifikaci pravou a nepravou (zmnožení důsledkem polyzomie příslušného chromozómu), v literatuře však většinou nebývají u genů *c-myc* a *ccnd1* rozlišovány. Za pravou amplifikaci jsme považovali poměr gen/chromozóm $\geq 2,2$. Pravá amplifikace *c-myc* byla nalezena u 6% (6/100) nepolyzomických vzorků, 12% (6/49) vzorků s polyzomií CH17, celkově u 8% vzorků nádorové tkáně (viz přílohy 2 a 1). Ve srovnání s nepravou amplifikací byl výskyt pravé amplifikace o 47% nižší. Většina studií cílené biologické léčby popisuje významnost amplifikace jednotlivých onkogenů. Nepravá amplifikace je většinou studií opomíjena. I ta však může ve fyziologii nádorů i jeho biologickém chování hrát významnou roli. Amplifikace *c-myc* je spojena se špatnou prognózou (**Varley et al., 1987**). Klinické studie prokazují korelaci amplifikace *c-myc* s pokročilým stádiem, histologickým gradingem a velikostí nádoru, vysokou proliferační aktivitou, postižením lymfatických uzlin, pozitivním statutem ER a PR, aneuploidii a vyšším věkem pacientů (**Escot et al., 1986; Nass & Dickson, 1997; Tavassoli et al., 1989, Tsukamoto et al., 2001**).

Amplifikace *ccnd1* se vyskytuje v 10-15% případů rakoviny prsu a bývá spojena s nadměrnou expresí cyklinu D1 (**Elsheikh et al., 2007; Reis-Filho et al., 2006; Seshadri et al., 1996**). V naší skupině pacientů byla amplifikace nalezena u 55,7% vzorků (tab 2.) a

v rámci studie u 37% vzorků (tab.3), což se značně liší od výsledků udávaných literaturou. Tento rozdíl může být dán rozdílem studovaných populací (do Referenční laboratoře jsou posíláni již předvybraní pacienti) a definicí amplifikace. Výskyt pravé amplifikace ve skupině studované v rámci bakalářské práce byl roven 10% (15/149), u polyzomických pacientů se amplifikace *ccnd1* vyskytovala ze 17% (8/47) (viz přílohy 1 a 2). Amplifikace *ccnd1* bývá spojena s pozitivním statutem PR a ER, kdy u pacientů s ER+ je amplifikace *ccnd1* nezávislým prognostickým faktorem. Je spojena s delší celkovou dobou přežití a přežitím bez známek nemoci (**Elsheikh et al., 2007; Reis-Filho et al., 2006**).

Polyzomie CH11 se vyskytuje až u 50% případů rakoviny prsu a byla u ní prokázána pozitivní korelace s vysokým histologickým gradingem, metastazováním do lymfatických uzlin, PR- statutem (**Tsukamoto et al., 2001**). V rámci analyzované skupiny vzorků se polyzomie CH11 vyskytovala u 17,4% (26/149), z nichž 42% (11/42) tvořily polyzomické pacientky. Výskyt polyzomie CH8 se popisuje přibližně u 20% případů nádoru prsu (**Behjati et al., 2005**) (**Sneige et al., 2006**). V námi analyzované skupině vzorků bylo 25,5% (38/149) vzorků s polyzomií CH8, z nichž 29% tvořily polyzomické pacientky.

V rámci bakalářské práce bylo vyšetřeno 151 pacientů s rakovinou prsu, z nichž u 49 byla nalezena polyzomie CH17. Jedná se o součást rozsáhlého projektu, jehož cílem je nalezení specifických prognostických a prediktivních markerů, které napomohou při stanovení optimální léčby pacientů s invazivním karcinomem prsu. V rámci bakalářské práce se podařilo prokázat korelaci mezi zvýšeným počtem kopií chromozómu 17 a vyšším věkem pacientek. Další významnou prokázanou korelací je výskyt vyššího počtu kopií chromozómu 17 spíše u nižších histopatologických stádií. V navazující diplomové práci se této problematice budeme dále věnovat. Budou vybrány další geny, které by mohli mít vliv na prognózu či predikci léčby u pacientů s karcinomem prsu. Předpokládáme, že získáme další klinická data, o která vyšetřovaný soubor pacientů rozšíříme. Rozšíření souboru pacientů nám pomůže potvrdit již nalezené korelace, případně objevit závislosti nové, které usnadní rozhodnutí při výběru nejprospěšnějšího léčebného režimu nebo objasní prognózu konkrétního pacienta.

VII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abaza M.S., Al-Saffar A., Al-Sawan S., Al-Attayah R. (2008) c-myc antisense oligonucleotides sensitize human colorectal cancer cells to chemotherapeutic drugs, *Tumour Biol.* **29**, 287-303.

Adam Z., Vorlíček J., Koptíková J., a kolektiv (2003) *Obecná onkologie a podpůrná léčba*, pp. 19-39, 48-76, 206-208, Grada Publishing a.s., Praha, ČR.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) *Molecular biology of the cell*, 4th ed., pp. 263-5, 1016, 1017, 1338, Garland Science, NY, USA.

appendix.bf.jcu.cz/Dolezal/vyuka/dna/molbio.htm (2010)

Arango D., Corner G.A., Wadler S., Catalano P.J., Augenlicht L.H. (2001) c-myc/p53 interaction determines sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil in vitro and in vivo, *Cancer Res.* **61**, 4910-5.

Behjati F., Atri M., Najmabadi H., Nouri K., Zamani M., Mehdipour P. (2005) Prognostic value of chromosome 1 and 8 copy number in invasive ductal breast carcinoma among Iranian women: an interphase FISH analysis, *Pathol. Oncol. Res.* **11**, 157-63.

Berns E.M., Foekens J.A., van Putten W.L., van Staveren I.L., Portengen H., de Koning W.C., Klijn J.G. (1992) Prognostic factors in human primary breast cancer: comparison of c-myc and HER2/neu amplification, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 13-9.

Bethesda M.D. (2009) Appendix C: Human Embryonic Stem Cells and Human Embryonic Germ Cells . In *Stem Cell Information* [World Wide Web site]. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009 [cited Wednesday, March 31, 2010] Available at <<http://stemcells.nih.gov/info/2001report/appendixc>>

Blackwood E.M., Eisenman R.N. (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc, *Science* **251**, 1211-7.

Carlson R.W., Moench S.J., Hammond M.E., Perez E.A., Burstein H.J., Allred D.C., Vogel C.L., Goldstein L.J., Somlo G., Gradishar W.J., Hudis C.A., Jahanzeb M., Stark A., Wolff A.C., Press M.F., Winer E.P., Paik S., Ljung B.M. (2006) HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations, *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **4**, Suppl 3:S1-22, quiz S23-4.

Carroll J.S., Swarbrick A., Musgrove E.A., Sutherland R.L.(2002) Mechanisms of growth arrest by c-myc antisense oligonucleotides in MCF-7 breast cancer cells: implications for the antiproliferative effects of antiestrogens, *Cancer Res.* **62**, 3126-31.

Cibula D., Petruželka L., et al. (2009) *Onkogynekologie*, pp. 49-59, 69 , Grada Publishing a.s., Praha, ČR.

Chin P.C., D'Mello S.R. (2005) Brain chemotherapy from the bench to the clinic: targeting neuronal survival with small molecule inhibitors of apoptosis, *Front. Biosci.* **10**, 552-568.

Dang C.V., Resar L.M., Emison E., Kim S., Li Q., Prescott J.E., Wonsey D., Zeller K. (1999) Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp. Cell Res.* **253**, 63-77.

Daniel A.R., Knutson T.P., Lange C.A.(2009) Signaling inputs to progesterone receptor gene regulation and promoter selectivity, *Mol. Cell Endocrinol.* **308**, 47-52

Dean-Colomb W., Esteva F.J.(2008) Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond, *Eur. J. Cancer* **44**, 2008-12.

DeVita T., Lawrence Jr. T.S., Rosenberg S.A.(2008) Hellman, and Rosenberg's cancer : principles & practice of oncology, 8th ed., Vol. 2, pp. 1606-1641.

Diehl J.A., Cheng M., Roussel M.F., Sherr C.J. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization, *Genes Dev.* **12**, 3499-511.

Drissi R., Zindy F., Roussel M.F., Cleveland J.L. (2001) c-Myc-mediated regulation of telomerase activity is disabled in immortalized cells, *J. Biol. Chem.* **276**, 29994-30001.

Dušek L., Mužík J., Kubásek M., Koptíková J., Žaloudík J., Vyzula R. (2005) *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Masarykova univerzita., [cit. 2010-3-08]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.

Eckschlanger T., Průša R. (2002) *Laboratorní vyšetření v onkologii*, 16-23, TRITON, Praha, ČR.

Escot C., Theillet C., Lidereau R., Spyrtos F., Champeme M.H., Gest J., Callahan R. (1986) Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas, *Proc. Natl. Acad. .Sci. USA* **83**, 4834-8.

Espinosa A.B., Taberero M.D., García-Macías M.C., Primo D., Bernal A.G., Cruz J.J., Ramos M., Font de Mora J., Gómez Alonso A., Orfao A. (2003) Her-2/neu gene amplification in familial vs sporadic breast cancer. Impact on the behavior of the disease, *Am. J. Clin. Pathol.* **120**, 917-27.

Evans H. S., Lewis C. M., Robinson D., Bell C. M. J., Miller H., Hodgson S.V. (2001) Incidence of multiple primary cancers in a cohort of women diagnosed with breast cancer in southeast England, *Br. J. Cancer* **84**, 435-440.

Friedenson B. (2005) BRCA1 and BRCA2 Pathways and the Risk of Cancers Other Than Breast or Ovaria, *MedGenMed.* **7**, 60.

Fuqua S.A., Wiltschke C., Zhang Q.X., Borg A., Castles C.G., Friedrichs W.E., Hopp T., Hilsenbeck S., Mohsin S., O'Connell P., Allred D.C.(2000) A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions, *Cancer Res.* **60**, 4026-4029.

Garcia I., Dietrich P.Y., Aapro M., Vauthier G., Vadas L., Engel E. (1989) Genetic alterations of c-myc, c-erbB-2, and c-Ha-ras protooncogenes and clinical associations in human breast carcinomas, *Cancer Res.* **49**, 6675-9.

Hopp T. A., Fuqua S. A. W. (2003) Estrogen and progesteron receptor in Braest cancer, Vol. 1, *Encyclopedia of Hormones* (Henry H. L., Norman A. W., eds.), pp. 573-578, Elsevier, Oxford, UK.

Hosokawa Y, Arnold A.(1998) Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression, *Genes Chromosomes Cancer.* **22**, 66-71.

Huang Z., Willett W. C., Coldfe G. A., Hunter D. J., Manson J. E., Rosner B., Speker F. E., Hankinson S. E. (1999) Waist Circumference, Waist:Hip Ratio, and Risk of Breast Cancer in the Nurses' Health Study, *Am. J. Epidemiol.* **150**(12), 1316-24.

Chadwick R. (2001) Signing on the genetic line, *Nature* **412**, 680-681.

Chène P. (2003) Inhibiting the p53–MDM2 interaction: an important target for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* **3**, 102-9.

Kenemans P., Verstraeten R.A., Verheijen R.H. (2004) Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer, *Maturitas.* **49**, 34-43.

Key T., Appleby P., Barnes I., Reeves G. (2002) : Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, J. Natl. Cancer Ind.* **94**, 606-616.

Kim J.K., Diehl J.A.(2009) Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer, *J. Cell Physiol.* **220**,292-6.

Klener P. (2002) *Klinická onkologie*, pp.39,40, 495-512, Galén a Karolinum, Praha, ČR.

Koutecký J., Eckschlanger T., Kabíčková E., Mališ J., Stejskalová E., Prausová J., Malinová B., Linke Z., Průša R., Masopust J., Kodet R., Goetz P., Hochová I., Neuwirth J., Křížová H., Hoch J., Bartůňková J., Kolář P., Kozák J., Vonka V., Cetkovský P., Bubeník J., Hašková H. (2004) *Klinická onkologie I*, pp. 11-14, 15-32, 100-110, Riopress, Praha, ČR.

Krishnamurti U., Hammers J. L., Atem F.D., Storto P.D., Silverman J.F. (2009) Poor prognostic significance of unamplified chromosome 17 polysomy in invasive breast carcinoma, *Mod. Pathol.* **22**, 1044-8.

Lakhani S.R., Van De Vijver M.J., Jacquemier J., Anderson T.J., Osin P.P., McGuffog L., Easton D.F. (2002) The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2, *J. Clin. Oncol.* **20**, 2310-8.

Lerebours F., Lidereau R.(2002) Molecular alternation in sporadic breast cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **44**, 121-141

Lüscher B., Larsson L.G.(1999) The basic region/helix - loop - helix/leucine zipper domain of Mycproto-oncoproteins: Function and regulation, *Oncogene* **18**, 2955–66.

Marchiò C., Lambros M.B., Gugliotta P., Di Cantogno L.V., Botta C., Pasini B., Tan D.S., Mackay A., Fenwick K., Tamber N., Bussolati G., Ashworth A., Reis-Filho J.S., Sapino A.(2009) Does chromosome 17 centromere copy number predict polysomy in breast cancer? A fluorescence in situ hybridization and microarray-based CGH analysis, *J Pathol.* **219**, 16-24.

Mateyak M.K., Obaya A.J., Sedivy J.M. (1999) c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points, *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4672-83

- Moore M.R., Zhou J.L., Blankenship K.A., Strobl J.S., Edwards D.P., Gentry R.N.(1997) A sequence in the 5' flanking region confers progesterin responsiveness on the human c-myc gene, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **62**, 243-52
- Motokura T., Bloom T., Kim H.G., Jüppner H., Ruderman J.V., Kronenberg H.M., Arnold A. (1991) A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene, *Nature* **350**, 512-5.
- Mužik J., Dušek L., Abrahámová J., Koptíková J.(2009) Stručný přehled epidemiologie zhoubného novotvaru prsu v České republice, *Onkologie* **3**, 7-11
- Nass S.J., Dickson R.B.(1997) Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis, *Breast Cancer Res Treat.* **44**, 1-22.
- Nilsson J.A., John L Cleveland J.L. (2003) Myc pathways provoking cell suicide and cancer, *Oncogene* **22**, 9007–9021.
- Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F.(2004) *Klinická genetika Thompson & Thompson*, 6th ed., pp. 301-321, Triton, Praha, ČR.
- Ooi A., Suzuki S., Nakazawa K., Itakura J., Imoto I., Nakamura H., Dobashi Y. (2009) Gene amplification of Myc and its coamplification with ERBB2 and EGFR in gallbladder adenocarcinoma, *Anticancer Res.* **29**, 19-26.
- Pavlišta D., Daneš J., Gatěk J., Housenková J., Novotný J., Skovajsová M., Tesařová P., Trnková M., Zikán M. (2008) *Neinvazivní karcinomy prsu*, pp. 20, 21, 28-39, 47-51, MAXDORF, Praha, ČR.
- Petruželka L., Konipásek B., Aschermannová A., Helmichová E., Janků F., Kliebl Z., Mališ J., Mareš P., Novotný J., Příbylová O., Špička I., Tesařová P. (2003) *Klinická onkologie*, pp. 9-27, 185-195, Karolinum, Praha, Česká republika
- Racek J., Eiselt J., Friedecký B., Holeček., Nekulová M., Pittrová H., Rušavý Z., Senfl V., Šavlová M., Těšínský P., Verner M., (2006) *Klinická biochemie*, pp. 247-257, Galén, Praha, ČR.
- Reis-Filho J.S., Savage K., Lambros M.B., James M., Steele D., Jones R.L., Dowsett M. (2006) Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis, *Mod. Pathol.* **19**, 999-1009.

Ross J.S., Fletcher J.A., Linette G.P., Stec J., Clark E., Ayers M., Symmans W.F., Pusztai L., Bloom K.J.(2003) The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy, *Oncologist*. **8**, 307-325.

Salido M. , Tusquets I., Corominas J.M., Suarez M., Espinet B.,Corzo C., Bellet M., Fabregat X., Serrano S., Solé F. (2005) Polysomy of chromosome 17 in breast cancer tumors showing an overexpression of ERBB2: a study of 175 cases using fluorescence insitu hybridization and immunohistochemistry, *Breast Cancer* **7**,267-273

Seshadri R., Lee C.S., Hui R., McCaul K., Horsfall D.J., Sutherland R.L.(1996) Cyclin DI amplification is not associated with reduced overall survival in primary breast cancer but may predict early relapse in patients with features of good prognosis, *Clin. Cancer Res.* **2**, 1177-84.

Shackney S.E., Pollice A. A., Smith Ch. A., Janocko L. E., Sweeney L., Brown K. A., Singh S. G., Lingping Gu, Yakulis R., Lucke J.F. (1998) Intracellular coexpression of epidermal growth factor receptor, Her-2/neu, and p21^{flis} in human breast cancers: Evidence for the existence of distinctive patterns of genetic evolution that are common to tumors from different patiens, *Clin. Cancer Res.* **4**, 913-28.

Sheiness D., Fanshier L., Bishop J.M.(1978) Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29, *J. Virol.* **28**, 600-10

Shuai X.M., Han G.X., Wang G.B., Chen J.H. (2006) Cyclin D1 antisense oligodexoyneucleotides inhibits growth and enhances chemosensitivity in gastric carcinoma cells, *World J. Gastroenterol.* **12**, 1766-9.

Shuai X., Han G., Wang G. Effects of cyclin D1 antisense oligodeoxyneucleotides on the growth and expression of G1 phase regulators in gastric carcinoma cells, *J. Huazhong. Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* **23**, 396-8, 406.

Schuster-Böckler B., Bateman A. (2008) Protein interactions in human genetic diseases, *Genome Biol.* **9**, R9.

Sneige N., Liu B., Yin G., Gong Y., Arun B.K. (2006) Correlation of cytologic findings and chromosomal instability detected by fluorescence in situ hybridization in breast fine-needle aspiration specimens from women at high risk for breast cancer, *Mod. Pathol.* **19**, 622-9.

Snustad D. P., Simmons M. J.(2009) *Genetika*, pp.127-139, 665-689, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.

Soldati R., Wargon V., Cerliani J.P., Giulianelli S., Vanzulli S.I., Gorostiaga M.A., Bolado J., do Campo P., Molinolo A., Vollmer G., Lanari C.(2009) Inhibition of mammary tumor growth by estrogens: is there a specific role for estrogen receptors alpha and beta?, *Breast Cancer Res. Treat.*

Supino R., Scovassi A.I.(2004) *c-myc*: a double-headed Janus that regulates cell survival and death, *Gene Ther. Mol. Biol.* **8**, 385-394.

Takahashi Y., Kawate S., Watanabe M., Fukushima J., Mori S., Fukusato T. (2007) Amplification of *c-myc* and cyclin D1 genes in primary and metastatic carcinomas of the liver. *Pathol. Int.* **57**, 437-442.

Tavassoli M., Quirke P., Farzaneh F., Lock N.J., Mayne L.V., Kirkham N.(1989) *c-erbB-2/c-erbA* co-amplification indicative of lymph node metastasis, and *c-myc* amplification of high tumour grade, in human breast carcinoma, *Br. J. Cancer.* **60**, 505-10.

Thompson D., Easton D.F, the Breast Cancer Linkage Consortium(2002) Cancer Incidence in BRCA1 Mutation Carriers, *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1358-65.

Tikhomirov O., Carpenter G. (2003) Epidermal growth factor (EGF) receptor signaling, Vol. 1, *Encyclopedia of Hormones* (Henry H. L., Norman A. W., eds.), pp. 549-555, Elsevier, Oxford, UK

Tsukamoto F., Miyoshi Y., Egawa C., Kasugai T., Takami S., Inazawa J., Noguchi S. (2001) Clinicopathologic analysis of breast carcinoma with chromosomal aneusomy detected by fluorescence in situ hybridization, *Cancer* **93**, 165-70.

Turner N., Tutt A., Ashworth A.(2005) Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours, *Curr. Opin. Pharmacol.* **5**, 388-393.

Vanden Bempt I., Van Loo P., Drijckoningen M., Neven P., Smeets A., Christiaens M.R., Paridaens R., De Wolf-Peeters C.(2008) Polysomy 17 in breast cancer: clinicopathologic significance and impact on HER-2 testing, *J. Clin. Oncol.* **26**, 4869-74.

Varley J.M., Swallow J.E., Brammar W.J., Whittaker J.L., Walker R.A.(1987) Alterations to either c-erbB-2(neu) or c-myc proto-oncogenes in breast carcinomas correlate with poor short-term prognosis, *Oncogene* **1**, 423-30.

Viale G.(2008) Be precise! The need to consider the mechanisms for CEP17 copy number changes in breast cancer, *J. Pathol.* **219**, 1-2.

Vyzula R., Neumanová R., Skovajsová R. (2004) Karcinom prsu, Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob (Adam Z., Vorlíček J., Vaniček J., et al., eds.), pp. 213-230, Grada publishing a.s., Praha, ČR.

Wang T.C., Cardiff R.D., Zukerberg L., Lees E., Arnold A., Schmidt E.V. (1994) Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice, *Nature* **369**, 669-71.

Watters A.D., Going J.J., Cooke T.G, Bartlett J.M. (2003) Chromosome 17 aneusomy is associated with poor prognostic factors in invasive breast carcinoma, *Brest. Cancer. Res. Treat.* **77**, 109-14.

Weston A., Hartus C.C. (2003) Chemical carcinogenesis, *Cancer Medicine*, 6th. ed. (Holland J.F. ed.) Williams & Williams, Baltimore, MD, USA. Dostupný z www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed6&part=A4991 (2010)

www.linkos.cz/odbornici/info_praxe/standardy_html.php?t=5 (2010)

www.natural-disease-solutions.com/breast-cancer-information.html (2010)

Yakes F.M., Chinratanalab W., Ritter C.A., King W., Seelig S., Arteaga C.L.(2002) Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt Is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action, *Cancer Res.* **62**, 4132-41.

Zaha D.C., Lazăr E., Lăzureanu C.(2010) Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer, *Rom. J. Morphol. Embryol.* **51** , 85-89.

Zhang H., Berezov A., Wang Q., Zhang G., Drebin J., Murali R., Greene M.I. (2007) ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies, *J. Clin. Invest.* **117**, 2051-8.

VIII. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Akt	rodina signálních Ser/Thr protein kinas
amp.	amplifikace
AP1	„Activator protein 1“; transkripční protein; heterodimerizuje s Fos a Jun
ARF	„Alternative reading frame“
ASCO/CAP	„American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists“
ASODN	antisense oligodeoxynukleotidy
ATM	„Ataxia telangiectasia mutated“; gen lokalizovaný 11q22-23; Ser/Thr protein kinasa; regulátor buněčného cyklu a opravy DNA
Bax	„Bcl-2-associated X protein“; transkripční faktor, dimerizuje s c-Myc
Bcl-2	„B-cell lymphoma 2“; rodina genů kódující pro- a protiapoptické faktory
Bcl-xl	Transmembránový mitochondriální protein; anti-apoptický protein; člen Bcl-2
bHLHZip	„helix-loop-helix“ leucinový zip; struktura c-Myc
BMI	„body mass index“; statistický ukazatel míry obezity
bp	„base pairs“; počet nukleotidových párů
<i>brca1</i>	„Breast Cancer 1“; tumorsupresorový gen, lokalizovaný na 17q12-21; EC: 7.1.9.
<i>brca2</i>	„Breast Cancer 2“; tumorsupresorový gen, lokalizovaný na 13q12-13; EC: 7.1.9.
CA 15-3	„Cancer antigen 15-3“; tumorový marker; EC: 7.1.1.
<i>ccnd1</i>	gen s lokalizací 11q13 kódující cyklin D1; jiné označení <i>prad1</i> , <i>bcl1</i> ; EC: 7.1.11.
CDK	„Cyclin dependent kinase“; Ser/Thr protein kinasa; regulátor buněčného cyklu
CDK4	„Cyclin dependent kinase 4“; Ser/Thr protein kinasa
CDK6	„Cyclin dependent kinase 6“; Ser/Thr protein kinasa
CEA	„Carcinoembryonic antigen“; tumorový marker; EC:7.1.2.
<i>c-erb-B2</i>	viz. <i>her-2/neu</i>
CEP	„Centromeric Enumeration Probe“; α -satelitní sonda pro centromerickou oblast
CEP17	α -satelitní sonda pro centromerickou oblast chromozómu 17

CIP-KIP	rodina inhibitorů komplexů Cdk-cyklin; zahrnuje p21, p27, p57
CKI	„Cycline-dependent kinase inhibitor protein“
<i>c-myc</i>	protoonkogen, lokalizovaný v oblasti 8q24.12-q24.13, c-Myc, transkripční faktor; EC:7.1.10.
<i>c-src</i>	lidský gen pro protoonkogenní Tyr kinasu
Da	Dalton, jednotka enzymové aktivity
DAG	diacyl glycerol
DCIS	„Ductal carcinoma <i>in situ</i> “
dUTP	2'-deoxyuridin-5'-trifosfát
E2F	transkripční faktory interagující s pRb tumor supresorem
EGF	„Epidermal growth factor“; vazebný ligand EGFR
EGFR	„Epidermal Growth Factor Receptor 1“; také HER-1, ErbB1; EC:7.1.7.
ER	Estrogenový receptor; EC: 7.1.4.
ER- α	podjednotka α estrogenového receptoru
ER- β	podjednotka β estrogenového receptoru
EMSY	jaderný protein; podílí se na transkripci a opravě DNA
FISH	„Fluorescent <i>in situ</i> hybridization“; fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
<i>fos</i>	gen kódující protein, který v kombinaci s jun tvoří transkripční faktor
GAP	„GTPase activating protein“
GSK-3beta	„Glykogen synthase kinase-3beta“; Tyr kinasa; pozitivní regulátor degradace CCND1
Grb2	„Growth factor receptor-bound protein 2“; přenašeč signálu
GTPasa	Kinasa štěpící guanosin-3-fosfát
HER-1	Viz. EGFR
<i>her-2/neu</i>	protoonkogen na 17q; gen pro receptor epidermálního růstového faktoru 2 (HER-2/neu); označován také jako ErbB2, c-erbB-2, neu, TKR1, NGL; EC: 7.1.6.
HER-3	Receptor epidermálního růstového faktoru 3; také ErbB3
HER-4	Receptor epidermálního růstového faktoru 4; také ErbB4
hTERT	„Telomerase Reverse Transcriptase“; katalytická podjednotka telomerasy
<i>h-ras</i>	lidský gen pro protein zapojený do signalizace vyvolané růstovými faktory
CH17	chromozóm 17
CHEK2	„Checkpoint kinase 2“; také CHK2, Rad53
IHC	„immunohistochemistry“; imunohistochemie

Ig	Iminoglobulin
IGF-1	„insulin-like growth factor 1“; polypeptid se aminokyselinovou sekvencí vysoce podobnou inzulinu
INK	Rodina inhibitorů komplexu CDK4/6-cyklin
<i>jun</i>	Gen kódující protein, který v kombinaci s fos tvoří transkripční faktor
kb	„kilo base pairs“; také kbp; tisíce nukleotidových párů
LCIS	„lobular carcinoma <i>in situ</i> “
L-Myc	člen Myc rodiny transkripčních faktorů
LSI	„Locus Specific Identifier“; lokusově specifická sonda
Mad	„Max Dimerization protein“; tvoří heterodimer s Max; kompetuje s Myc
Mad1	„Mitotic Arrest Deficiency protein 1“; dimerizuje s Max
Mad3	„Mitotic Arrest Deficiency protein 3“; dimerizuje s Max
Mad4	„Mitotic Arrest Deficiency protein 4“; dimerizuje s Max
MAPK	„Mitogen Activated Protein Kinase“
Max	„Myc-Associated factor X“; tvoří heterodimer s c-Myc a Mad
MC29	Retrovirus ptačí myelocystózy
MCAK	„Mitotic Centromere-Associated Kinesin“; složka kinetochoru
MEK	„Mitogen-activated protein kinase kinase“; kinasa MAP kinasy
Mnt	Dimerizační partner Max
Mxi1	„MAX-interacting protein 1“; dimerizační partner Max
<i>myb</i>	protonkogen kódující Myb transkripční faktor
Myc	rodina transkripčních faktorů; L-Myc, C-Myc, N-Myc
N-myc	člen Myc rodiny transkripčních faktorů
p	krátké rameno chromozómu
p15	člen INK; inhibitor komplexů CDK4/6-cyklin
p16	člen INK; inhibitor komplexů CDK4/6-cyklin
p18	člen INK; inhibitor komplexů CDK4/6-cyklin
p19	člen INK; inhibitor komplexů CDK4/6-cyklin
p21	člen CIP-KIP; inhibitor komplexů CDK-cyklin
p27	člen CIP-KIP; inhibitor komplexů CDK-cyklin
p53	tumorsupresor; lokalizovaný na 17p; EC: 7.1.8.
p57	člen CIP-KIP; inhibitor komplexů CDK-cyklin
p185 ^{HER}	protein kódovaný <i>her-2/neu</i>
PI3	inositol trifosfát
PI3P	Fosfoinositol-3-fosfát

PIP2	fosfatidyl inositol-3-fosfát
PKC/PKA	Protein kinasa C/protein kinasa A
PLC	Fosfolipasa C
pol.	polyzomie
PR	Progesteronový receptor vyskytující se v isoformách PR-A, PR-B; EC: 7.1.5
pRB	„Retinoblastoma protein“; tumorsupresor
q	dlouhé rameno chromozómu
Ras	G-protein, signální protein v MAPK dráze; protoonkogen
Rb1	„retinoblastoma 1“; nádorový supresorový gen, lokalizovaný na 13q14.2
<i>rel</i>	onkogen; transkripční faktor
SCF	podjednotka ubiquitin ligasy
Sos	„Son of Sevenless“; faktor vyměňující guaninové nukleotidy; spřažen s Ras
src	„sarcoma“; protoonkogenní tyrosinová kinasa
SSA	„single-strand annealing“; jednovláknové zacelení; opravaDNA
SV40-T	„Simian Vacuolating Virus 40 T Ag“; protoonkogen
tp53	gen kódující p53; tumorsupresorový gen
TPA	Tkáňový polypeptidový antigen; EC: 7.1.3
TGF- α	„Transforming growth factor α “; vazebný ligand EGFR
TOP2A	topoizomerasa II alfa; rovněž topoII α
VEGF	„Vascular endothelial growth factor“; stimulátor růstu nových cév
WB	„wash buffer“; promývací pufr
WCP	„Whole Chromosome Painting“; celochromozómová malovací sonda
wt-p53	„wild-type p53“
WS1	„washing solution 1“; promývací roztok 1
WS2	„washing solution 2“; promývací roztok 2

IX. PŘÍLOHY**Příloha 1: tabulka výsledků vzorků s polyzomií CH17 (CH17 \geq 2,5)**

č.	CEP17	CH11	CCND1	CCND/11	CEP8	C-MYC	Cmyc/8	věk
1	3,68	2,00	2,00	1,00	2,41	2,76	1,15	46
2	3,74	2,69	3,01	1,12	2,11	3,00	1,42	62
3	2,84	2,15	8,72	4,05	2,18	2,90	1,33	59
4	3,20	2,18	3,13	1,43	2,40	5,96	2,48	41
5	2,94	2,19	2,27	1,03	2,16	4,26	1,97	59
6	2,52	2,07	2,18	1,05	2,08	2,28	1,10	47
7	4,81	2,18	2,43	1,11	2,03	4,57	2,25	55
8	2,73	2,04	2,05	1,01	2,02	2,08	1,03	55
9	2,96	2,06	2,13	1,03	2,35	2,64	1,12	53
10	2,91	2,10	21,14	10,07	2,11	2,46	1,17	72
11	4,23	2,20	4,57	2,00	2,41	2,67	1,11	74
12	2,79	2,10	2,20	1,05	3,15	3,64	1,16	62
13	4,04	2,00	2,30	1,15	2,00	2,33	1,17	-
14	2,55	2,36	2,96	1,25	2,04	2,09	1,02	65
15	2,64	2,11	2,23	1,06	3,09	3,15	0,98	65
16	2,68	2,05	2,08	1,01	2,10	2,16	1,03	61
17	2,93	1,95	2,10	1,07	2,02	2,10	1,04	55
18	3,12	1,83	2,00	0,91	1,92	2,07	1,08	56
19	2,52	1,89	1,92	1,02	2,02	2,06	1,02	56
20	2,75	2,18	20,00	9,17	3,27	3,52	1,08	47
21	2,71	2,32	3,42	1,47	2,40	3,58	1,49	49
22	2,60	2,84	2,91	1,02	2,09	20,00	9,57	67
23	2,63	2,22	20,00	9,01	2,08	2,12	1,02	59
24	2,63	2,58	2,77	1,07	2,08	2,30	1,11	41
25	3,03	1,94	2,42	1,25	2,54	3,34	1,31	49
26	4,09	2,56	3,00	1,17	2,52	2,66	1,06	58
27	3,75	2,04	20,00	9,80	2,13	15,00	7,04	53
28	3,00	2,03	2,05	1,01	1,98	2,04	1,03	57
29	3,16	2,02	2,16	1,07	2,04	2,11	1,03	53
30	4,56	2,65	3,46	1,30	4,67	13,31	2,85	62
31	2,53	2,27	5,55	2,42	1,69	1,79	1,06	63
32	2,51	3,46	3,78	1,09	2,10	2,22	1,06	52
33	2,56	2,61	2,79	1,07	2,02	2,06	1,02	69
34	2,54	2,85	3,18	1,16	2,04	2,14	1,05	38
35	2,90	2,33	4,82	2,07	1,82	1,90	1,04	57
36	2,66	2,22	8,00	3,60	2,14	2,63	1,23	56
37	2,63	3,75	4,25	1,13	2,00	2,00	1,00	70
38	2,51	2,20	2,29	1,04	2,78	3,10	1,12	55
39	3,20	2,17	2,92	1,35	2,52	2,76	1,10	77
40	3,20	2,83	3,14	1,11	2,40	2,40	1,00	65
41	2,56	2,01	2,13	1,06	2,08	2,18	1,05	52
42	2,68	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	64
43	3,93	3,00	3,59	1,20	2,62	3,13	1,20	75
44	3,08	2,10	2,99	1,42	2,06	5,34	2,59	65
45	2,76	2,10	2,10	1,00	2,02	2,06	1,02	63
46	4,60	2,24	7,16	3,20	1,96	2,18	1,11	55
47	2,51	2,02	2,32	1,15	2,37	2,58	1,10	66
48	2,55	-	-	-	3,64	3,83	1,05	63
49	3,40	-	-	-	2,84	5,92	2,08	58

Příloha 2: Tabulka výsledků vzorků s fyziologickým počtem CH17

č.	CEP17	CH11	CCND1	CCND/11	CEP8	C-MYC	Cmyc/8	Věk
1	2,22	2,00	2,14	1,00	3,22	3,93	1,22	58
2	2,07	3,46	6,40	1,85	2,70	4,62	1,71	31
3	2,07	2,10	2,22	1,06	3,44	10,00	2,90	55
4	2,42	2,17	2,23	1,03	2,24	3,16	1,41	-
5	2,24	2,18	2,17	1,00	3,19	4,61	1,45	55
6	2,04	2,11	2,19	1,04	2,04	2,32	1,14	54
7	2,08	2,44	4,00	1,64	2,65	2,43	0,92	48
8	2,14	2,06	2,20	1,07	2,18	2,32	1,04	59
9	2,06	2,10	2,24	1,07	2,06	2,14	1,04	44
10	2,07	2,06	2,13	1,04	2,00	2,11	1,06	43
11	2,06	2,08	2,11	1,01	2,09	2,21	1,06	59
12	1,89	2,02	2,05	1,01	2,11	2,20	1,04	53
13	2,06	2,22	2,37	1,07	2,14	2,20	1,03	42
14	2,12	2,00	2,72	1,36	2,86	6,18	2,16	53
15	2,09	2,00	2,40	1,20	2,00	2,00	1,00	40
16	2,49	2,33	20,00	8,58	2,00	3,32	1,66	62
17	2,15	2,28	2,06	0,90	2,45	2,62	1,07	65
18	1,93	2,20	2,55	1,16	2,31	2,83	1,23	52
19	2,03	2,47	3,27	1,32	2,82	3,13	1,1	41
20	1,93	2,04	2,43	1,19	2,32	5,24	2,56	53
21	2,19	1,96	2,37	1,21	1,83	2,15	1,17	63
22	2,50	2,11	2,96	1,40	8,54	9,08	1,06	43
23	2,17	2,64	2,78	1,05	4,26	10,00	2,35	50
24	2,00	2,06	2,30	1,12	10,00	10,00	1,00	41
25	2,00	2,76	2,52	0,91	4,38	2,42	0,55	41
26	2,08	2,31	3,38	1,46	2,35	3,19	1,36	62
27	2,13	2,17	2,51	1,16	2,44	3,28	1,34	50
28	2,23	2,78	4,02	1,45	3,69	2,43	0,66	62
29	2,17	2,00	10,12	5,06	3,76	10,10	2,75	56
30	2,09	2,27	3,36	1,48	2,95	2,28	0,77	50
31	2,00	2,03	2,98	1,47	-	-	-	53
32	2,00	3,03	3,35	1,11	2,50	3,22	1,29	39
33	2,20	2,82	2,89	1,02	2,56	2,92	1,14	39
34	2,00	2,06	2,16	1,05	2,10	2,14	1,02	53
35	2,14	2,14	2,25	1,05	2,12	2,16	1,09	52
36	2,04	2,50	2,83	1,13	2,29	2,57	1,12	59
37	2,00	2,16	2,62	1,21	2,08	2,17	1,05	56
38	2,07	2,14	2,26	1,06	2,16	2,22	1,03	57
39	2,12	2,06	2,12	1,03	2,12	2,42	1,14	53
40	2,15	2,55	3,94	1,55	2,48	2,95	1,19	49
41	2,13	2,08	2,34	1,13	2,21	2,58	1,17	69
42	2,01	2,09	2,26	1,08	2,22	2,37	1,07	54
43	2,03	2,22	2,65	1,20	2,00	2,22	1,10	56
44	2,04	2,11	2,21	1,25	2,00	2,00	1,00	54
45	2,32	2,27	2,85	1,26	2,13	2,90	1,36	35
46	2,09	3,26	3,89	1,19	2,68	3,48	1,30	75
47	2,15	2,00	3,89	1,19	2,68	3,48	1,30	69
48	2,21	2,44	3,49	1,43	2,12	2,40	1,13	53
49	2,17	2,23	4,50	2,02	2,56	5,41	2,14	61
50	2,00	2,09	2,44	1,17	2,29	3,09	1,35	30
51	2,08	2,20	3,99	1,81	2,39	2,82	1,18	65
52	2,19	2,28	3,66	1,60	2,64	3,41	1,29	54

53	1,75	2,43	4,93	2,03	2,41	3,82	1,59	65
54	2,12	2,05	2,17	1,06	2,12	2,17	1,02	47
55	2,01	2,06	2,13	1,03	2,11	2,18	1,03	47
56	2,32	2,68	9,12	3,40	2,14	3,00	1,40	36
57	1,98	2,06	2,26	1,10	2,00	2,32	1,16	46
58	2,37	2,00	2,28	1,14	2,00	2,18	1,09	59
59	2,14	2,00	2,34	1,17	2,00	2,00	1,00	42
60	2,08	2,00	2,46	1,23	-	-	-	67
61	2,26	2,00	2,68	1,34	3,48	5,04	1,45	68
62	1,95	2,96	5,94	2,01	2,41	3,24	1,34	61
63	1,98	2,13	2,73	1,28	2,36	3,11	1,32	56
64	2,10	2,18	2,32	1,06	2,08	2,28	1,10	52
65	2,19	2,00	2,24	1,12	2,00	2,00	1,00	65
66	2,00	2,23	3,81	1,70	2,14	3,38	1,58	49
67	2,12	2,17	2,58	1,19	2,08	2,61	1,25	56
68	2,14	2,51	3,07	1,22	2,42	3,12	1,29	56
69	2,02	2,02	2,76	1,37	2,12	2,50	1,18	56
70	2,12	2,26	2,71	1,20	2,03	2,30	1,13	43
71	2,23	2,20	10,00	4,55	1,98	2,14	1,08	61
72	2,00	2,00	2,22	1,11	2,58	3,14	1,22	69
73	1,91	2,10	3,44	1,64	2,00	2,08	1,04	39
74	2,27	2,00	2,72	1,36	2,46	2,50	1,02	50
75	2,27	3,16	3,52	1,11	1,40	2,70	1,93	61
76	2,22	2,04	2,38	1,17	2,00	2,06	1,03	61
77	2,19	2,00	2,08	1,04	2,24	4,28	1,91	64
78	2,47	2,19	3,44	1,57	2,04	2,46	1,21	61
79	2,10	2,00	2,20	1,10	2,00	2,36	1,18	53
80	2,45	2,00	3,67	1,83	2,98	4,06	1,36	54
81	2,43	2,00	2,22	1,11	2,06	3,04	1,48	54
82	2,15	2,12	4,36	2,06	2,30	3,88	1,69	71
83	2,16	2,00	2,38	1,19	3,20	5,38	1,68	55
84	2,05	2,06	8,40	4,10	2,16	3,28	1,52	63
85	2,46	2,00	2,22	1,11	2,00	2,12	1,06	65
86	1,98	2,00	2,28	1,14	2,02	10,00	4,95	52
87	1,98	2,00	3,20	1,60	3,00	6,48	2,16	46
88	2,10	2,18	3,28	1,50	2,00	2,38	1,19	62
89	2,33	2,26	4,00	1,77	2,18	2,56	1,17	48
90	2,38	2,04	3,38	1,66	2,14	3,50	1,64	70
91	2,23	2,44	8,34	3,42	2,70	3,24	1,20	57
92	2,24	2,00	2,22	1,10	2,08	2,14	1,03	42
93	2,07	2,26	3,28	1,45	2,00	3,10	1,55	58
94	2,18	2,00	2,14	1,07	2,00	3,26	1,63	39
95	2,17	2,00	2,18	1,09	2,00	2,00	1,00	48
96	2,16	2,24	2,32	1,04	2,22	2,42	1,09	58
97	2,42	3,71	4,08	1,10	4,08	4,76	1,17	50
98	2,00	2,20	2,40	1,09	2,08	2,18	1,05	72
99	2,11	2,26	2,56	1,13	2,11	2,16	1,02	39
100	2,22	2,84	5,10	1,80	2,06	2,46	1,19	52
101	2,16	2,16	20,00	9,26	2,10	20,00	9,52	65
102	2,28	2,27	4,84	2,13	2,20	2,89	1,31	37